



**Facultad de ciencias experimentales**

**EFECTOS DE LA TOXICIDAD DE  
BORO EN LOS GENOTIPOS  
SILVESTRE Y MUTANTE *nced3* DE  
*Arabidopsis thaliana***

**Miguel Ángel Macho Rivero  
Sevilla, 2015**

**Universidad Pablo de Olavide**

**EFFECTOS DE LA TOXICIDAD DE BORO EN LOS  
GENOTIPOS SILVESTRE Y MUTANTE *nced3* DE  
*Arabidopsis thaliana***

Memoria que presenta

**Miguel Ángel Macho Rivero**  
Para optar al grado de Doctor

Directores del trabajo

Dr. Agustín González Fontes de Albornoz  
Catedrático de Fisiología Vegetal

Dr. Juan José Camacho Cristóbal  
Profesor Titular de Fisiología Vegetal

Dra. M<sup>a</sup> Begoña Herrera Rodríguez  
Profesora Contratada Doctora de Fisiología Vegetal

## **AGRADECIMIENTOS**

A los directores de esta Tesis, D. Agustín González Fontes de Albornoz, D. Juan Camacho Cristóbal y Dña. María Begoña Herrera Rodríguez, por la dedicación y entusiasmo que han puesto en ella. A los doctores D. Jesús Rexach Benavides y Dña. María Teresa Navarro Gochicoa por los ánimos que me han transmitido. Estos años han pasado muy rápido, en parte gracias a los maravillosos compañeros que he tenido la oportunidad de conocer: Macarena Martín, Carlos Quiles, Cristina Muñoz, y a todos los alumnos de proyecto fin de master y de grado, gracias a todos.

A todas las personas que de un modo u otro han ayudado a la consecución de este proyecto. Al Área de Geodinámica Externa e Interna y en especial a Jose Manuel Bruque, por su tiempo y ayuda para la determinación de iones. Al Área de Biología Celular por estar siempre dispuestos a colaborar.

Gracias al doctor Anton Schaeffner (Institute of Biochemical Plant Pathology) y a todos los miembros de su laboratorio, por la grata acogida, y por la ayuda recibida en la determinación del flujo relativo de agua y en la realización de los ELISAS.

A todos mis amigos y amigas, en especial a Beatriz por haberme mostrado el camino a seguir para conseguir este objetivo.

El agradecimiento más especial va dirigido a mis padres, por haber trabajado tanto para que hoy yo pueda estar aquí y por haber sido siempre buenos ejemplos de afán y superación. Gracias por vuestro apoyo constante. Muchas gracias a mi hermana María del Mar por su tiempo y ayuda y por mostrarme que con dedicación todo se consigue.

Las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis doctoral han sido financiadas por los Ministerios de Ciencia e Innovación (BFU2009-08397) y Economía y Competitividad (BFU2012-37445) y la Junta de Andalucía (BIO-266 y P09-CVI-4721).

Por último, quiero agradecer especialmente a la Junta de Andalucía la concesión de una beca de Formación de Personal Docente e Investigador para la realización de esta tesis doctoral.

## Índice

Abreviaturas .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>I.1. ASPECTOS GENERALES DEL BORO</b> .....	4
I.1.1. El boro como nutriente esencial para las plantas .....	4
<b>I.2. FUENTES DE BORO</b> .....	5
I.2.1. Fuentes naturales de boro .....	5
I.2.2. Fuentes antropogénicas de boro .....	6
I.2.2.1. <u>Agua de riego</u> .....	6
I.2.2.2. <u>Efluentes industriales</u> .....	6
I.2.2.3. <u>Residuos mineros</u> .....	6
I.2.2.4. <u>Aplicación de fertilizantes</u> .....	7
<b>I.3. DISPONIBILIDAD DE BORO PARA LAS PLANTAS</b> .....	7
I.3.1. Absorción de boro por las raíces de las plantas y su carga en el xilema .....	8
I.3.2. Distribución del boro por la planta .....	9
<b>I.4. TOXICIDAD DE BORO EN LAS PLANTAS</b> .....	10
I.4.1. Síntomas de la toxicidad de boro en las plantas .....	11
I.4.2. Efectos fisiológicos de la toxicidad de boro .....	11
I.4.2.1. <u>Disminución del crecimiento de la planta</u> .....	11
I.4.2.2. <u>Descenso en los niveles de clorofilas y disminución de la tasa fotosintética</u> .....	11
I.4.2.3. <u>Estrés oxidativo y peroxidación de lípidos</u> .....	12
I.4.2.4. <u>Efectos sobre la división celular y los tejidos jóvenes</u> .....	12
I.4.2.5. <u>Efectos en la pared celular</u> .....	13
I.4.3. Efectos metabólicos de la toxicidad de boro .....	13
I.4.4. Tolerancia a la toxicidad de boro .....	14

<b>I.5. <u>ABSORCIÓN DE AGUA Y NUTRIENTES</u></b>	14
<b>I.5.1. Anatomía de la raíz</b>	14
I.5.1.1. <u>Banda de Caspary</u>	16
<b>I.5.2. Vías de absorción de agua y nutrientes en la raíz</b>	16
<b>I.5.3. Acuaporinas</b>	17
I.5.3.1. <u>Estructura de las acuaporinas</u>	19
I.5.3.2. <u>Especificidad del transporte</u>	20
<b>I.6. <u>HORMONAS VEGETALES</u></b>	20
<b>I.6.1. Ácido abscísico</b>	20
I.6.1.1. <u>Rutas de transducción de la señal de ABA</u>	21
I.6.1.2. <u>Papel del ABA en los estreses abióticos</u>	22
<b>I.6.2. Etileno</b>	22
I.6.2.1. <u>Rutas de transducción de la señal de etileno</u>	23
<b>II. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	25
<b>II.1. <u>MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO</u></b>	26
II.1.1. Cultivos hidropónicos	26
II.1.2. Cultivos <i>in vitro</i>	27
<b>II.2. <u>RECOGIDA Y PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL</u></b>	28
II.2.1. Cultivos hidropónicos	28
II.2.2. Cultivos <i>in vitro</i>	28
<b>II.3. <u>EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</u></b>	29
II.3.1. Extracción y manipulación del DNA genómico	29
II.3.1.1. <u>Genotipado del mutante insercional <i>nced3</i> por PCR</u>	29
II.3.2. Extracción y manipulación de RNA	31
II.3.2.1. <u>Extracción de RNA</u>	31

II.3.2.2. <u>Síntesis de DNA complementario (cDNA)</u> .....	34
II.3.2.3. <u>Diseño de cebadores para la Q-RT-PCR a tiempo real</u> .....	35
II.3.2.4. <u>RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR a tiempo real)</u> .....	36
<b>II.4. <u>ARQUITECTURA RADICAL Y ANÁLISIS FOLIAR</u></b> .....	37
II.4.1. <b>Análisis de la arquitectura radical</b> .....	37
II.4.2. <b>Análisis del área de la roseta</b> .....	37
<b>II.5. <u>ANÁLISIS HISTOQUÍMICO</u></b> .....	38
II.5.1. <b>Tinciones GUS</b> .....	38
II.5.2. <b>Clarificación de las raíces para la visualización de la banda de Caspary</b> .....	38
II.5.3. <b>Análisis de las líneas reporteras GFP</b> .....	39
II.5.4. <b>Localización histoquímica del anión superóxido</b> .....	39
<b>II.6. <u>ANÁLISIS DE PARÁMETROS ECOFISIOLÓGICOS</u></b> .....	39
II.6.1. <b>Determinación de la tasa de fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y concentración interna de CO<sub>2</sub></b> .....	40
II.6.2. <b>Medida de la abertura estomática</b> .....	40
II.6.3. <b>Medida de la fluorescencia de las clorofilas</b> .....	40
<b>II.7. <u>ANÁLISIS DE LA TRANSLOCACIÓN DE AGUA</u></b> .....	41
<b>II.8. <u>EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE DIVERSOS IONES Y METABOLITOS</u></b> .....	43
II.8.1. <b>Extracción y determinación del boro soluble e insoluble</b> .....	43
II.8.2. <b>Extracción y determinación de iones solubles</b> .....	44
II.8.3. <b>Extracción y determinación de carbohidratos solubles</b> .....	44
II.8.4. <b>Determinación de almidón</b> .....	45
II.8.5. <b>Determinación de la concentración de pigmentos</b> .....	46
II.8.6. <b>Determinación de fenoles</b> .....	46
<b>II.9. <u>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS</u></b> .....	47

<b>II.10. <u>EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ABSCÍSICO</u></b>	48
<b>II.10.1. Extracción</b>	48
<b>II.10.2. Purificación y cuantificación</b>	48
<b>II.11. <u>EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PIP</u></b>	49
<b>II.11.1. Aislamiento y cuantificación de proteínas microsomales</b>	49
<b>II.11.2. ELISA para la determinación de las proteínas PIP1 y PIP2</b>	50
<b>II.12. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u></b>	51
<b>III. RESULTADOS</b>	52
<b>III.1. <u>ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA RESPUESTA DE LAS RAÍCES DE ARABIDOPSIS A LA TOXICIDAD DE BORO</u></b>	53
<b>III.1.1. Análisis de la expresión génica mediante microarrays</b>	53
<b>III.1.2. Análisis de la expresión génica mediante Q-RT-PCR a tiempo real</b>	57
<b>III.1.2.1. Análisis de la expresión de genes relacionados con ABA y etileno</b>	57
<b>III.1.2.2. Análisis de la expresión génica mediante Q-RT-PCR a tiempo real de genes que intervienen en la formación de la banda de Caspary</b>	61
<b>III.2. <u>ESTUDIO DE LOS GENOTIPOS SILVESTRE Y MUTANTE <i>nced3</i> BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR TOXICIDAD DE BORO</u></b>	66
<b>III.2.1. Caracterización de mutantes <i>nced3</i> homocigóticos</b>	67
<b>III.2.1.1. Análisis de la expresión del gen <i>NCED3</i> en el mutante insercional <i>nced3</i></b>	67
<b>III.2.2. Efecto de la toxicidad de boro sobre el fenotipo del mutante <i>nced3</i></b>	68
<b>III.2.2.1. Análisis de la arquitectura radical</b>	68
<b>III.2.2.2. Morfología foliar y área de la roseta</b>	70
<b>III.2.3. Efecto de la toxicidad de boro sobre algunos parámetros ecofisiológicos</b>	72
<b>III.2.3.1. Tasa fotosintética e intercambio de gases</b>	72
<b>III.2.3.2. Abertura estomática y eficiencia en el uso del agua</b>	74

III.2.3.3. <u>Eficiencia del fotosistema II</u> .....	74
III.2.3.4. <u>Contenido de pigmentos fotosintéticos</u> .....	76
III.2.3.5. <u>Concentración de carbohidratos</u> .....	78
<b>III.2.4. Efecto de la toxicidad de boro sobre el contenido de boro</b> .....	79
<b>III.2.5. Efecto de la toxicidad de boro sobre el estrés oxidativo</b> .....	79
III.2.5.1. <u>Análisis histoquímico de la producción de anión superóxido</u> .....	82
III.2.5.2. <u>Actividades peroxidasa y glutatión reductasa</u> .....	83
III.2.5.3. <u>Contenido total de fenoles en hojas</u> .....	84
<b>III.2.6. Efecto de la toxicidad de boro sobre los contenidos de los principales iones</b> .....	85
III.2.6.1. <u>Contenido de aniones</u> .....	85
III.2.6.2. <u>Contenido de cationes</u> .....	86
<b>III.2.7. Efecto de la toxicidad de boro sobre el nivel radical de ácido abscísico</b> .....	87
<b><u>III.3. ANÁLISIS DEL TRANSPORTE DE AGUA EN LOS GENOTIPOS SILVESTRE Y MUTANTE <i>nced3</i> DE ARABIDOPSIS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR TOXICIDAD DE BORO</u></b> .....	89
III.3.1. Efecto de la toxicidad de boro sobre el transporte de agua hacia el vástago .....	89
III.3.2. Efecto de la toxicidad de boro sobre la expresión de genes de acuaporinas .....	92
III.3.3. Efecto de la toxicidad de boro sobre los contenidos de las proteínas PIP1 y PIP2 .....	94
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	96
<b><u>IV.1. LA TOXICIDAD DE BORO REDUCE EL CRECIMIENTO DE LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS DE ARABIDOPSIS</u></b> .....	97
<b><u>IV.2. LA TOXICIDAD DE BORO MODIFICA LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE INTERVIENEN EN LA BIOSÍNTESIS</u></b>	



<b><u>Y SEÑALIZACIÓN DE ABA</u></b> .....	99
<b><u>IV.3. LA TOXICIDAD DE BORO MODIFICA LA BANDA DE CASPARY</u></b> .....	100
<b><u>IV.4. LA TOXICIDAD DE BORO AFECTA A DIVERSOS</u></b> <b><u>PARÁMETROS ECOFISIOLÓGICOS</u></b> .....	103
<b>IV.4.1. Cambios en la tasa de transpiración, conductancia y abertura</b> <b>estomática</b> .....	103
<b>IV.4.2. Cambios en la tasa de fotosíntesis y en la eficiencia del PSII</b> .....	105
<b><u>IV.5. LA TOXICIDAD DE BORO REDUCE EL TRANSPORTE DE AGUA</u></b> .....	106
<b><u>V. CONCLUSIONES</u></b> .....	108
<b><u>VI. BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	111

**ABA:** ácido abscísico

**ACC:** ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico copia o complementario

**C<sub>i</sub>:** concentración interna de CO<sub>2</sub> (μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>)

**CTAB:** bromuro de hexadeciltrimetilamonio

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DMF:** N,N-Dimetilformamida

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**E:** transpiración (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**g<sub>s</sub>:** conductancia estomática (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

**GUS:** β-glucuronidasa

**MES:** ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato

**MOPS:** ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PF:** peso fresco

**Pn:** tasa de fotosíntesis neta (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

**PS:** peso seco

**p/v:** peso/volumen

**RGII:** ramnogalacturonano II

**RNA:** ácido ribonucleico

**ROS:** especies reactivas de oxígeno **rpm:** revoluciones por minuto

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**Taq DNA polimerasa:** DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*

**Tris-HCl:** tris(hidroximetil) aminometano clorhidrato

**V:** voltio

**v/p:** volumen/peso

**v/v:** volumen/volumen

**WUE:** (water use efficiency) eficiencia en el uso del agua

**X-Gluc:** ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D glucurónico

# I. INTRODUCCIÓN

## **I.1. ASPECTOS GENERALES DEL BORO**

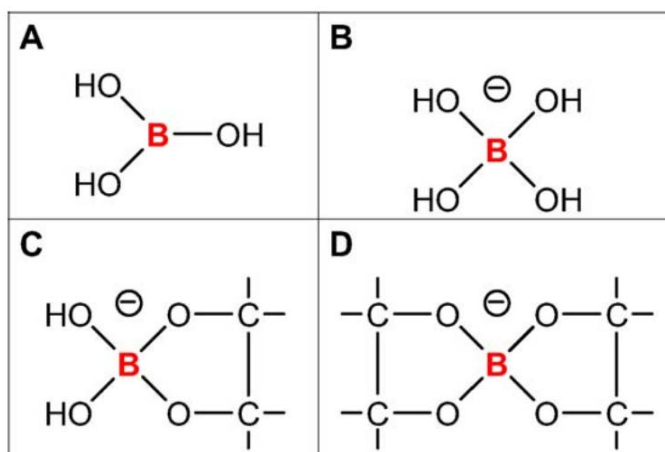
El boro es el elemento más electronegativo del Grupo 13 (período 2) de la tabla periódica. Es un átomo con tres electrones de valencia que forma enlaces de tipo covalente, fundamentalmente con átomos de oxígeno, y tiene propiedades intermedias entre elementos metálicos y no metálicos (Greenwood y Earnshaw, 1984).

El boro se descubrió por Davy, Gay-Lussac y Thenard en 1808. Este elemento tiene dos isótopos naturales estables,  $^{10}\text{B}$  y  $^{11}\text{B}$ , en una proporción del 19,78 y 80,22 %, respectivamente. A pesar de su baja abundancia en la naturaleza, este elemento se encuentra ampliamente distribuido tanto en la litosfera como en la hidrosfera (Bolaños et al., 2004).

### **I.1.1. El boro como nutriente esencial para las plantas**

Las primeras pruebas de la esencialidad del boro para el normal desarrollo de las plantas vasculares datan de los estudios de Warington (1923), quien observó que las plantas deficientes en boro presentaban raíces y tallos cortos de aspecto achaparrado. El boro, tanto en su forma de ácido bórico como de borato, puede formar complejos con una amplia variedad de compuestos biológicos que contienen dos grupos hidroxilo en configuración *cis* (Figura 1). En esta propiedad radica la principal función de este elemento en los sistemas biológicos (Bolaños et al., 2004).

A pesar de que el boro se caracterizó como esencial hace más de 90 años, actualmente no están claras todas las funciones de este elemento en las plantas vasculares. Hasta la fecha, la principal función conocida del boro en las plantas es el establecimiento de enlaces éster entre el anión borato y los residuos de apiosa de dos moléculas de ramnogalacturonano II (RGII) (Kobayashi et al., 1996). La formación de este complejo es esencial para la función y la estructura de la pared celular (O'Neill et al. 2004). Hoy en día se sabe que, además de las plantas vasculares, otros organismos con fotosíntesis oxigénica requieren boro para su normal desarrollo, tales como diatomeas y algunas especies marinas de algas flageladas (Loomis y Durst, 1992). También algunas especies de cianobacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  requieren boro para la formación del heterocisto (Mateo et al., 1986; Bonilla et al., 1990 y 1995; Bolaños et al., 1993).



**Figura 1.** Estructura química del ácido bórico (A), anión borato (B), y sus respectivos ésteres diol (C, D) (tomado de Bolaños et al., 2004).

## I.2. FUENTES DE BORO

### I.2.1. Fuentes naturales de boro

La concentración de boro en la naturaleza oscila entre los 5-10 mg/kg en rocas, 3-30 µg/kg en ríos (Power y Woods, 1997) y aproximadamente 4,5 mg/l en los océanos (Lemarchand et al., 2000).

La composición geológica del suelo va a determinar el contenido de boro presente en el medio. Así, por ejemplo, los suelos derivados de depósitos de sedimentos marinos contienen altas cantidades de boro y, al menos, 200 minerales son conocidos por estar compuestos de boro (Parks y Edwards, 2005; Herrera-Rodríguez et al., 2010).

Cuando este elemento se encuentra formando parte de la estructura cristalina de las rocas no está disponible para ser absorbido por las plantas. La erosión de la pedosfera por las reacciones químicas que tienen lugar en el suelo (reacciones de oxidación-reducción, ácido-base, disolución-precipitación) puede movilizar el boro presente en la composición de muchos minerales (Nable et al., 1997). La principal especie química de boro generada a partir de la erosión de los borosilicatos es el ácido bórico. Esta forma de boro presenta una alta solubilidad en el agua y es la forma preferentemente absorbida por las raíces (Hu y Brown, 1997; Power y Woods, 1997).

## **I.2.2. Fuentes antropogénicas de boro**

### **I.2.2.1. Agua de riego**

El agua de riego es el principal responsable de la acumulación excesiva de boro en los suelos, problema que se acentúa en las zonas áridas y semiáridas del planeta debido a la limitación de las precipitaciones y la necesidad de regar los cultivos (Nable et al., 1997). Además, la creciente demanda de agua para uso agrícola ha llevado a explorar la utilización de agua de mar desalinizada. El ácido bórico, con un  $pK_a$  de 9,25, se presenta como una molécula sin carga en medios neutros y ácidos, por lo que puede penetrar fácilmente a través de las membranas de ósmosis inversa. Sin la aplicación de un tratamiento adicional en las plantas desalinizadoras, este elemento no puede ser eliminado eficazmente del agua de mar. Por ejemplo, el boro en el agua del mar Mediterráneo después del proceso de ósmosis inversa tiene una concentración de 2 mg/l. Estos niveles de boro no suponen un peligro para la salud humana, pero resultan tóxicos para muchos cultivos (Yermiyahu et al., 2007). Por tanto, el desarrollo de una agricultura de regadío a partir de la desalinización de agua de mar podría agravar el problema de la toxicidad de boro en los próximos años (Shaffer et al., 2012). En el caso de España, aproximadamente un 22 % del agua desalinizada se utiliza para el riego en agricultura (Martínez-Beltrán et al., 2006).

### **I.2.2.2. Efluentes industriales**

El ácido bórico y las sales de boro son ampliamente utilizados en la industria para la fabricación de diversos productos tales como agentes blanqueadores (perborato sódico), tratamiento de pieles, cosméticos, productos químicos fotográficos, tejidos ignífugos, vidrio y porcelana, entre otros. El boro soluble presente en los efluentes industriales no puede ser eliminado por métodos convencionales de tratamientos de aguas residuales, por lo que es necesario aplicar una serie de procesos específicos para la eliminación de este elemento (Nable et al., 1997).

### **I.2.2.3. Residuos mineros**

Los compuestos oxigenados de boro están presentes en minerales importantes desde el punto de vista comercial como bórax, ulexita y colemanita (Kistler y Helvacı,

1994). La minería de superficie produce residuos inorgánicos carbonatados ricos en boro. La oxidación de estos materiales supone la liberación gradual de importantes cantidades de boro soluble al medio (Barth et al., 1990).

#### I.2.2.4. Aplicación de fertilizantes

La fertilización de cultivos supone una entrada directa de boro en el medio. Algunos fertilizantes, como el cloruro de potasio, pueden contribuir a aumentar las cantidades de boro en el suelo. También la fertilización mediante estiércol puede ayudar sustancialmente al aumento de la concentración de boro en el suelo (Muntean, 2009).

La deficiencia de boro es un problema ampliamente extendido en todo el mundo, pero de fácil solución. Un simple tratamiento fertilizante con bórax o ácido bórico resuelve el problema de la carencia de este elemento. No obstante, puede derivar en un problema de toxicidad para los cultivos debido al estrecho intervalo de concentraciones óptimas para este micronutriente (Nable et al., 1997).

### **I.3. DISPONIBILIDAD DE BORO PARA LAS PLANTAS**

La cantidad de boro disponible para las plantas depende de las características físico-químicas del suelo, como son el pH, la textura, los ciclos de humedad/sequía, la temperatura, el contenido de materia orgánica y el de arcillas (Goldberg, 1997). El pH del suelo es el principal parámetro que va influir en la disponibilidad de boro para las plantas (Gupta, 1979).

El ácido bórico se comporta como un ácido débil en solución acuosa. Así, cuando el pH del suelo es inferior a 7, el ácido bórico está presente en su forma no dissociada de ácido bórico; en cambio, a pH alcalino, este aparece en la forma dissociada de anión borato (Greenwood, 1984).



En consecuencia, en suelos neutros o ligeramente ácidos, el boro está presente en su forma de ácido bórico y este puede ser absorbido directamente por las plantas. Cuando el pH del suelo es superior a 7, la forma dissociada  $\text{B(OH)}_4^-$  es predominante y, debido a su carga negativa, queda principalmente adsorbida en las partículas de arcilla del suelo (Hu y Brown, 1997; Power y Woods, 1997).



### I.3.1. Absorción de boro por las raíces de las plantas y su carga en el xilema

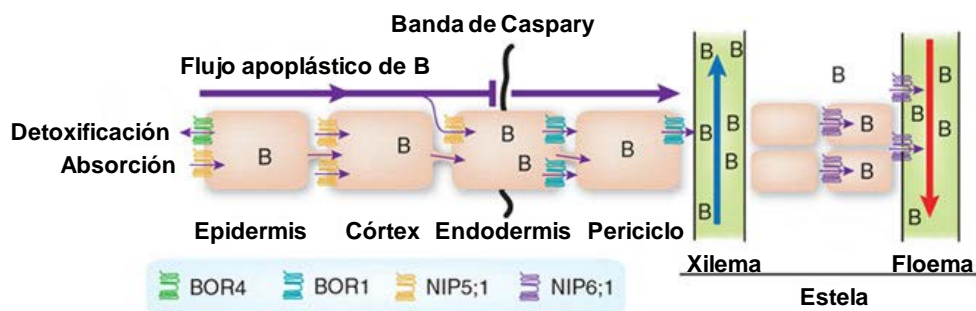
Dependiendo de la disponibilidad de boro en el suelo, este puede ser absorbido por las raíces mediante tres mecanismos diferentes: a) difusión pasiva a través de la membrana plasmática, b) transporte facilitado a través de canales, o c) transporte activo de alta afinidad inducido en respuesta a la baja concentración de boro en el medio (transportadores BOR) (Katsuhara et al., 2008; Tanaka y Fujiwara, 2008; Miwa y Fujiwara, 2010).

a) **Difusión pasiva.** En condiciones adecuadas o de excesiva disponibilidad de boro, la absorción del ácido bórico se produce por difusión pasiva a través de la membrana plasmática de las células de la raíz (Brown et al., 2002; Tanaka y Fujiwara, 2008). La bicapa lipídica es altamente permeable al ácido bórico, ya que este se comporta como una molécula neutra al pH del suelo ( $\text{pH} < 7.25$ ) (Brown y Shelp, 1997). El gradiente de concentración de boro necesario para el transporte pasivo dentro de la célula se ve favorecido por la formación de complejos de boro en el interior celular (Raven, 1980). Existe una gran cantidad de compuestos biológicos en el citosol, en la membrana y en la pared celular que pueden formar complejos con el boro; así, se han aislado y caracterizado complejos de boro con manitol, sorbitol, fructosa (Hu y Brown, 1997) y con RGII de la pared celular (Kobayashi et al., 1996; O'Neill et al., 1996).

b) **Transporte facilitado a través de canales.** Se ha caracterizado un canal de ácido bórico en *Arabidopsis thaliana* (AtNIP5;1), que se localiza en el plasmalema de las células y de los pelos de la raíz. Su función es crucial para la absorción de boro cuando su concentración es baja en el suelo (Figura 2) (Takano et al., 2006; Miwa y Fujiwara, 2010). Se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen aumenta la elongación radical bajo deficiencia en boro (Kato et al., 2009; Takano et al., 2010).

c) **Transporte activo.** Diversos estudios fisiológicos sugieren la existencia de un transporte activo de boro en las raíces cuando hay baja disponibilidad de este elemento (Figura 2) (Pfeffer et al., 1999; Dannel et al., 2000 y 2002; Stangoulis et al., 2001b). El transportador BOR1 fue el primero identificado como esencial para el desarrollo normal de las plantas bajo condiciones de deficiencia de boro (Noguchi et al., 1997). El transportador de alta afinidad BOR1 es necesario para la carga xilemática de boro en

condiciones de deficiencia y se encuentra localizado en la cara interna de las células de la endodermis y del periciclo (Takano et al., 2002).



**Figura 2.** Transporte radial de boro en la raíz (modificado de Robert y Friml, 2009).

Recientemente, se han identificado seis genes que codifican proteínas que poseen más del 60 % de similitud con BOR1. Los seis genes parálogos son At3g62270, At3g06450, At1g15460, At1g74810, At5g25430 y At4g32510, y se denominan *BOR2-7*, respectivamente. El parólogo BOR2 resulta ser el más similar al transportador BOR1. El papel de BOR2 parece ser crucial para la formación del complejo RGII-boro y el crecimiento de la raíz bajo condiciones de deficiencia (Miwa et al., 2013). Por otro lado, el transportador BOR4 se sobreexpresa en condiciones de toxicidad de boro en el medio. Se ha demostrado que su función es asistir en la detoxificación del exceso de boro en la planta mediante la secreción de este elemento desde la raíz hacia el exterior (Miwa et al., 2007).

### 1.3.2. Distribución del boro por la planta

En las plantas vasculares, el transporte de boro desde la raíz hacia los distintos órganos del vástago se realiza a través del xilema y viene determinado, en gran medida, por la tasa de transpiración de la planta (Raven, 1980; Shelp et al., 1995; Eichert y Goldbach, 2010). Además, el boro puede transportarse hacia los tejidos vegetativos y reproductivos vía floema (Shelp et al., 1995; Matoh y Ochiai, 2005), si bien la movilidad del boro a través de este tejido vascular difiere entre las distintas especies y las distintas condiciones ambientales (Brown y Shelp, 1997; Eichert y Goldbach, 2010). Se ha propuesto un mecanismo basado en la formación de complejos de boro con carbohidratos que poseen grupos alcohol (manitol, sorbitol, galactitol y mio-inositol)

para el transporte de este micronutriente por el floema (Brown y Hu, 1996; Hu y Brown, 1997; Eichert y Goldbach, 2010; Ruuhola et al., 2011). De hecho, se ha observado que plantas transgénicas de tabaco con niveles de sorbitol superiores a los del silvestre tienen una mayor capacidad para transportar boro por el floema y son más tolerantes a la deficiencia en boro (Bellaloui et al., 1999; Brown et al., 1999). Sin embargo, el transporte de boro por el floema, en especial hacia los tejidos jóvenes, también ocurre en especies de plantas que no son capaces de producir ese tipo de carbohidratos, aunque el transporte no es tan eficiente (Shelp et al., 1998; Huang et al., 2001 y 2008; Stangoulis et al., 2001a; Takano et al., 2001; Matoh y Ochiai, 2005). En condiciones de bajo aporte de boro, se ha identificado un canal de ácido bórico en *A. thaliana* (NIP6;1) que está implicado en la transferencia de esta molécula desde el xilema al floema en los vástagos jóvenes (Figura 2) (Tanaka y Fujiwara, 2008; Tanaka et al., 2008; Miwa y Fujiwara, 2010).

#### **I.4. TOXICIDAD DE BORO EN LAS PLANTAS**

El boro es un micronutriente que se caracteriza por tener un intervalo de concentraciones óptimas muy estrecho (Gupta, 1979). Los altos niveles de boro están presentes de forma natural debido a la composición química del suelo, o pueden ser incorporados al medio mediante diversas fuentes de origen antropogénico (Nable et al., 1997). La toxicidad de boro es un problema importante que puede afectar al rendimiento de los cultivos en las zonas áridas y semiáridas del planeta, como las regiones andinas del norte de Chile, sur de Australia, norte de África y el oeste de California (Nable et al., 1997; Roessner et al. 2006; Tariq y Mott, 2007). En estas zonas se ven favorecidos los procesos de evaporación y este elemento tiende a acumularse en la capa más superficial del suelo (Reid, 2007).

En cambio, la deficiencia de boro es un problema más recurrente que la toxicidad. Este se extiende sobre todo por las zonas de climas lluviosos, donde se produce la lixiviación de este elemento hacia las capas más profundas del suelo (Shorrocks, 1997; Yan et al., 2006). Este problema de falta de boro puede ser resuelto de una forma sencilla mediante la aplicación de fertilizantes o enmiendas ricas en este elemento (ácido bórico o bórax). Sin embargo, resulta más complicado solventar el problema de la toxicidad. Las técnicas disponibles para la mejora de suelos contaminados con exceso

de boro se basan en el cultivo de variedades tolerantes y en la aplicación de enmiendas al suelo, tanto de calcio como de silicio (Siddiqui et al., 2013).

#### **I.4.1. Síntomas de la toxicidad de boro en las plantas**

Los síntomas visibles de las plantas expuestas a una alta concentración de boro se manifiestan en forma de necrosis en la región marginal de las hojas maduras (Miwa et al., 2007). Este efecto se debe a que este elemento es transportado de forma pasiva gracias a la corriente de transpiración y se acumula en los márgenes de las hojas. Sin embargo, estos síntomas no aparecen en las plantas donde existe una importante retranslocación de boro vía floema como, por ejemplo, en el manzano (*Malus* ssp.), el albaricoque (*Prunus* ssp.) o el peral (*Pyrus* ssp.). En estas especies los efectos de la toxicidad de boro se manifiestan en primer lugar en las zonas meristemáticas y en los frutos. Además, se observa un engomado en las axilas de las hojas y se producen lesiones de color marrón a lo largo de los tallos y pecíolos (Brown y Shelp, 1997).

En cambio, no se observan síntomas visibles de toxicidad de boro en las raíces, ya que las concentraciones de este elemento siguen siendo relativamente bajas en comparación con las encontradas en las hojas (Nable, 1988).

#### **I.4.2. Efectos fisiológicos de la toxicidad de boro**

##### **I.4.2.1. Disminución del crecimiento de la planta**

El exceso de boro produce un retraso en el desarrollo y una reducción del tamaño de las plantas, así como del número, tamaño y peso de los frutos (Paull et al., 1992; Nable et al., 1997).

También se observa una disminución del crecimiento radical (Aquea et al., 2012). Se ha demostrado que la toxicidad de boro produce alteraciones en la división celular a nivel del meristemo apical (Liu et al., 2000; Aquea et al., 2012).

##### **I.4.2.2. Descenso en los niveles de clorofilas y disminución de la tasa fotosintética**

El exceso de boro tiene efectos negativos en la fotosíntesis. Se ha demostrado que la toxicidad de boro produce una disminución en la tasa fotosintética neta y modifica el

contenido de pigmentos de las hojas (Lovatt y Bates, 1984). En plantas de calabacín (*Cucurbita pepo*) y pepino (*Cucumis sativus*) tratadas con toxicidad de boro se observó una disminución de la relación de clorofilas *a/b* (Landi et al., 2013a). Esto podría reflejar una pérdida de proteínas implicadas en la captación de la luz como son las ubicadas en las antenas y en los centros de reacción (Adam y Baker, 1998). Además, diversos experimentos muestran los efectos negativos del exceso de boro sobre la eficiencia neta del fotosistema II (Guidi et al., 2011; Landi et al., 2013a,b).

#### I.4.2.3. Estrés oxidativo y peroxidación de lípidos

El exceso de boro causa daños estructurales en las clorofilas. Bajo estas circunstancias un exceso de energía lumínica induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando un estrés fotooxidativo a las plantas (Landi et al., 2013b). Estas ROS incrementan la peroxidación de los lípidos de membrana, causan daños en las proteínas y ácidos nucleicos e interfieren en los procesos de desarrollo, pudiendo incluso provocar la muerte celular (Mullineaux y Baker, 2010).

Para evitar el daño producido por estas ROS, la planta induce la producción de diversas sustancias con actividad antioxidante como el ácido ascórbico o el glutatión. También se incrementa la actividad de diversas enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa o la ascorbato peroxidasa, entre otras (Cervilla et al., 2007; Ardic et al., 2009). Estudios previos han demostrado que los genotipos tolerantes a la toxicidad de boro presentan una mayor actividad de estas enzimas antioxidantes, es decir, una mayor capacidad de destoxificación de las ROS (Ardic et al., 2009; Landi et al., 2013a,b).

#### I.4.2.4. Efectos sobre la división celular y los tejidos jóvenes

Los tejidos jóvenes muestran una mayor susceptibilidad a la toxicidad de boro que los tejidos maduros. Esto se debe a una más alta sensibilidad de los procesos metabólicos relacionados con la división y crecimiento celulares en estos tejidos jóvenes. Los altos niveles de boro afectan de manera negativa a la mitosis y la división celular (Liu et al., 2000). Así, se ha demostrado en plantas de haba (*Vicia faba*) que concentraciones entre 1 y 10 mM de boro detienen la mitosis en el meristemo apical de la raíz, además de observarse un aumento de las mitosis anormales (Reid et al., 2004).

#### I.4.2.5. Efectos en la pared celular

La toxicidad de boro induce la deposición de suberina y lignina en las raíces (Reid et al., 2004). Así, en plantas de soja (*Glycine max*) tratadas con boro 5 mM se observó un aumento de la suberización de las raíces que provocó una disminución del flujo radial de agua hasta el cilindro central (Ghanati et al., 2005). Estos resultados concuerdan con el aumento de la deposición de suberina en las paredes celulares de células de tabaco tratadas con exceso de boro (Ghanati et al., 2002).

Se ha propuesto que la pared celular podría influir en la tolerancia al exceso de boro. En este sentido se ha sugerido que las pectinas de la pared celular podrían bloquear el exceso de boro de tal manera que la planta eludiría los efectos tóxicos de su acumulación en el citoplasma (Hu et al., 1996). Sin embargo, experimentos realizados con plantas de girasol mostraron que la pared celular de las raíces no era capaz de unir boro adicional bajo elevadas concentraciones de dicho elemento (Dannel et al., 1999). Esta hipótesis fue también descartada en otro estudio con trigo y cebada, donde genotipos sensibles y tolerantes a la toxicidad de boro no presentaron cambios significativos en la cantidad de ácido urónico, un importante componente estructural de las pectinas (Mahboobi et al., 2001).

#### **I.4.3. Efectos metabólicos de la toxicidad de boro**

El boro, ya sea como ácido bórico o borato, forma complejos con las moléculas que contienen grupos hidroxilos libres en configuración *cis*. Además del RGII, la ribosa es un compuesto de gran importancia biológica que presenta grupos hidroxilos en configuración *cis* dentro del anillo de furanosa. Así, la unión del boro a moléculas de transferencia de energía que contienen ribosa como son ATP, NADPH y NADH ha sido demostrada mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (Hunt, 2002). Además, los grupos hidroxilos de las ribosas del extremo de 3' del RNA quedan expuestos, por lo que en condiciones de exceso de boro, este puede reaccionar con dicho extremo e inhibir el proceso de *splicing* del mRNA (Shomron y Ast, 2003).

#### I.4.4. Tolerancia a la toxicidad de boro

Existen plantas que presentan importantes diferencias en su capacidad para crecer en los suelos con concentraciones tóxicas de boro (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tolerancia relativa de diferentes cultivos a la concentración de boro en el agua de riego (basado en Moss y Nagpal, 2003).

Muy sensible ( $< 0,5$ mg/l)	Sensible ( $< 0,5$ mg/l)	Tolerante (4-6 mg/l)	Muy tolerante (6-15 mg/l)
Limonero	Nogal	Remolacha	Algodón
Frambueso	Cerezo	Tomate	Espárrago
	Ciruelo	Sorgo	
	Cebolla	Alfalfa	
	Naranja		

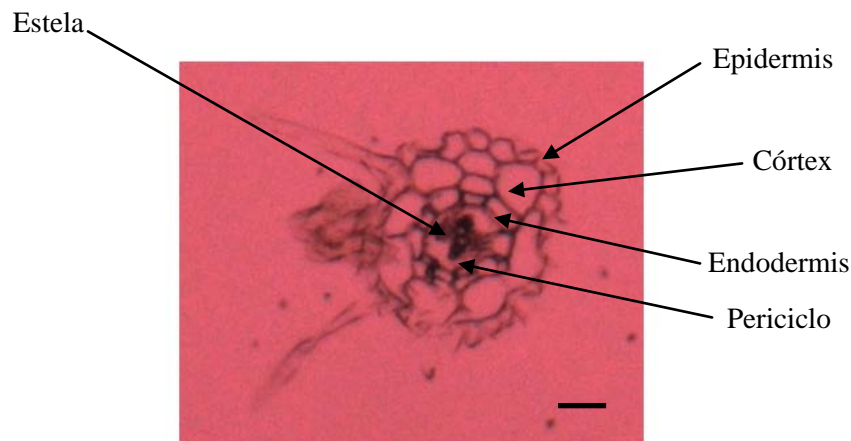
La tolerancia a la toxicidad de boro está asociada a una menor absorción y acumulación de este elemento en los tejidos de la planta (Nable, 1988). Se ha comprobado que este es un mecanismo común en muchas especies de plantas para hacer frente a este tipo de estrés (Paul et al., 1992). Para estudiar los mecanismos fisiológicos mediante los cuales se consigue acumular una menor cantidad de boro en los tejidos se han utilizado variedades tolerantes a la toxicidad de boro. Así, se ha demostrado que estas especies tolerantes poseen mecanismos activos de eflujo de boro desde la raíz hacia el exterior, de manera que consiguen mantener una concentración interna de boro menor que la del exterior (Reid, 2007).

### I.5. ABSORCIÓN DE AGUA Y NUTRIENTES

#### I.5.1. Anatomía de la raíz

Las raíces presentan dos niveles de organización. Desde un punto de vista transversal, sus células se organizan de una manera concéntrica. En *A. thaliana*, la estructura radial de la raíz es relativamente simple, ya que posee una sola capa de cada tipo de células. La capa más externa está compuesta por las células de la epidermis y

más hacia el interior se encuentra la capa formada por las células del córtex. A continuación se encuentra la capa de células de la endodermis, que delimita la estela o cilindro central. En la parte más externa de este se encuentra el periciclo y más adentro están los haces vasculares constituidos por el xilema y el floema (Figura 3) (Taiz y Zeiger, 2010).



**Figura 3.** Corte transversal de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Escala 20  $\mu$ m.

Desde una vista longitudinal, la raíz se divide en tres zonas principales: meristemática, elongación y de maduración.

La cofia protege el meristemo apical que alberga las divisiones celulares que permiten el crecimiento de la raíz. La tasa de división celular en el ápice de la raíz es relativamente baja y tiene lugar en una región del ápice denominada centro quiescente. Después de varias generaciones de lentas divisiones celulares, las células de la raíz se desplazan 0,1 mm desde el ápice para comenzar a dividirse más rápidamente. La división celular disminuye nuevamente a 0,4 mm desde el ápice y las células se expanden igualmente en todas las direcciones (Taiz y Zeiger, 2010).

La zona de elongación empieza aproximadamente de 0,7 a 1,5 mm desde el ápice. En esta zona las células se alargan de forma rápida y finalmente sufren una división para dar lugar a un anillo central de células denominado endodermis (Taiz y Zeiger, 2010).



Las células de la raíz necesitan varios días para abandonar la zona de división celular; sin embargo, la expansión a su tamaño maduro en la zona de elongación solo dura de 6 a 8 horas (Tsang et al., 2011).

Los pelos radicales, que abarcan una amplia superficie para la absorción de agua y solutos, aparecen en primer lugar en la zona de maduración.

#### I.5.1.1. Banda de Caspary

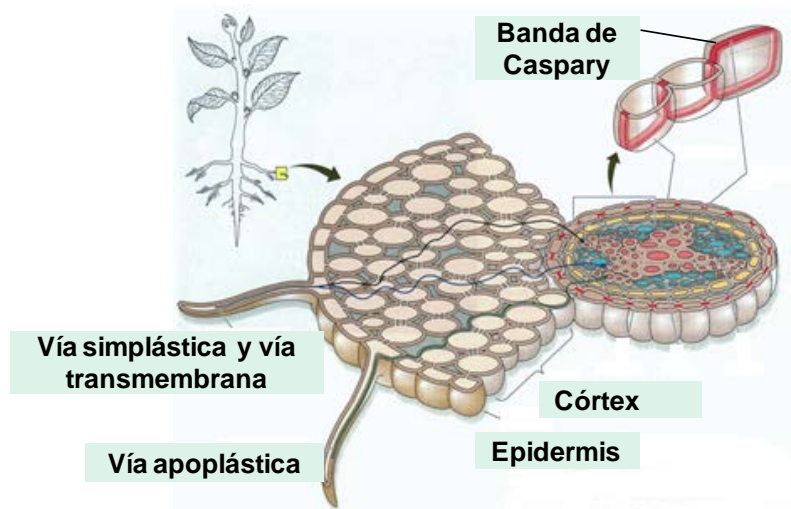
La banda de Caspary es una barrera que se desarrolla a partir de modificaciones de la pared celular a nivel de la endodermis. Esta banda impermeable fue descrita por primera vez por Robert Caspary en 1865, y está formada por la deposición de diversos compuestos como lignina y suberina. Su carácter hidrofóbico hace que actúe como una barrera a la difusión de agua y nutrientes, interrumpiendo el flujo apoplástico en la raíz. Por tanto, el agua y los nutrientes se ven obligados a entrar por la vía simplástica, pasando a través de la membrana plasmática para poder cruzar la endodermis (Schreiber et al., 1999).

Recientemente, se han identificado unas nuevas proteínas necesarias para la correcta formación de la banda de Caspary. Estas proteínas se denominan CASP (*Casparian Strip Proteins*) y existen cinco tipos diferentes (CASP1-5) (Roppolo et al., 2011).

#### **I.5.2. Vías de absorción de agua y nutrientes en la raíz**

En el transporte de agua y nutrientes en la raíz se pueden diferenciar dos componentes. Por un lado, el transporte axial, que consiste en el movimiento del agua a lo largo de los vasos del xilema hasta las partes aéreas. Por otro lado, el transporte radial de agua desde el suelo hasta los vasos del xilema, que implica tres vías diferentes (Steudle y Peterson, 1998): la vía apoplástica, en la cual el agua se mueve a través de la pared celular y de los espacios intercelulares; la vía simplástica, que incluye el movimiento del agua a través de los plasmodesmos y el citoplasma; y la vía transcelular, en la que el agua pasa a través de las membranas celulares (Figura 4). Las dos últimas vías para el transporte de agua y solutos no pueden ser diferenciadas y la suma de las dos se denomina transporte de célula a célula. Sin embargo, existen pruebas

de que la vía transcelular es el componente principal en el transporte célula a célula (Steudle, 2001).



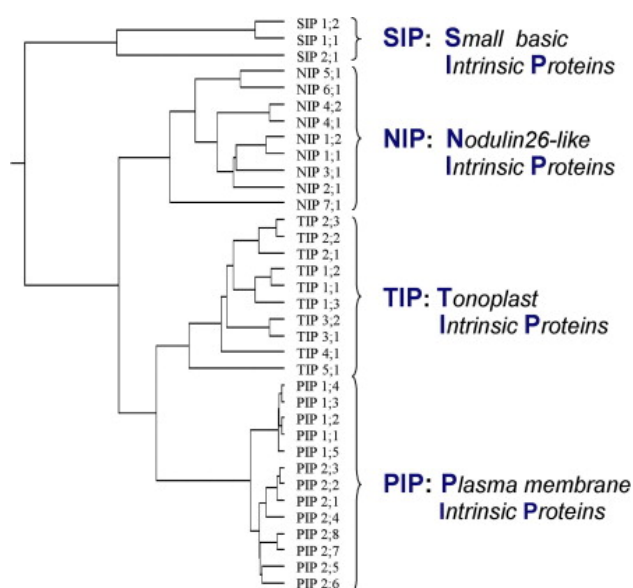
**Figura 4.** Las diferentes vías de entrada de agua en la raíz. La línea verde representa el flujo de agua apoplástico, la línea negra representa la vía simplástica y la línea azul representa la vía transcelular (modificado de Taiz y Zeiger, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, en la endodermis la banda de Caspary rompe la continuidad de la vía apoplástica. El agua y los solutos son obligados a pasar a través de la membrana plasmática con el fin de cruzar la endodermis y continuar su camino hasta el xilema. Estos procesos se ven facilitados en gran medida por la presencia de canales transmembrana (acuaporinas, canales iónicos) y transportadores.

### I.5.3. Acuaporinas

En el caso de las plantas, de toda el agua absorbida solo un 20 % es necesaria para el metabolismo; el resto se evapora a través de los estomas. Aunque el agua puede penetrar al interior de las células por simple difusión a través de las membranas, también existen una serie de proteínas, llamadas acuaporinas, que actúan como canales transmembrana y mejoran la permeabilidad de las membranas biológicas (Agre et al., 1987; Preston et al., 1992). Las acuaporinas son una familia multigénica de Proteínas Intrínsecas de Membrana (MIP), originalmente identificada por su abundancia en las membranas celulares de eritrocitos (Macey, 1984; Benga et al., 1986). Las plantas vasculares se caracterizan por tener un importante número de genes que codifican estas

MIP. Por ejemplo, se han identificados 35 en *A. thaliana* (Johanson et al., 2001) (Figura 5), 31 en maíz (Chaumont et al., 2001) y 33 en arroz (Sakurai et al., 2005).



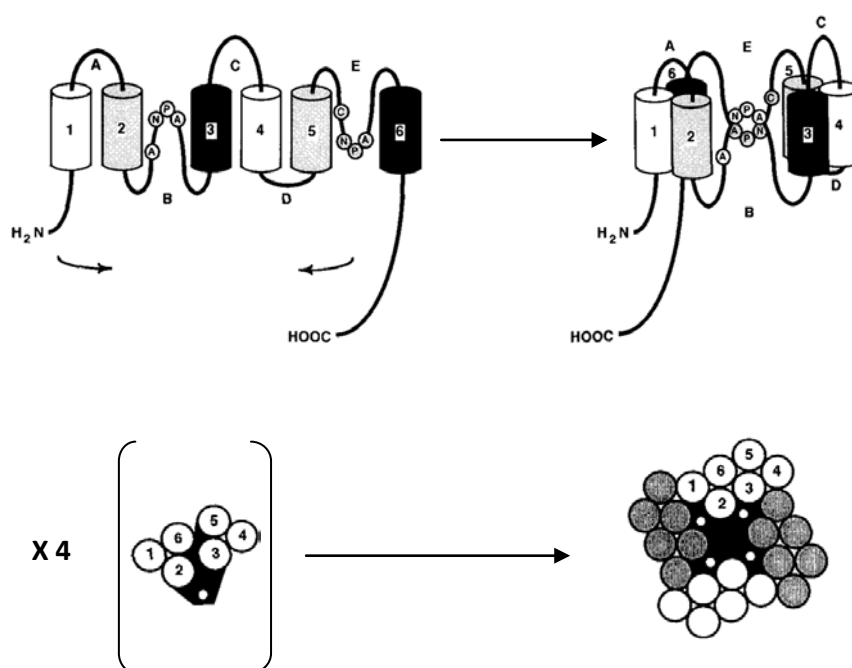
**Figura 5.** Árbol filogenético de la familia de acuaporinas de *A. thaliana* (tomado de Maurel, 2007).

De acuerdo con las secuencias de aminoácidos y su localización celular, las MIP se dividen en las siguientes subfamilias denominadas: PIP (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*), TIP (*Tonoplast Intrinsic Proteins*), NIP (*Nodulin 26-like Intrinsic Proteins*), SIP (*Small Basic Intrinsic Proteins*). Las PIP constituyen la familia más importante en las plantas vasculares y se dividen en dos tipos, PIP1 y PIP2. En *A. thaliana* hay cinco isoformas de PIP1 y ocho isoformas de PIP2. Las proteínas PIP1 muestran poca eficiencia en el transporte de agua cuando son expresadas en sistemas heterólogos, aunque se ha demostrado que la isoforma PIP1;2 contribuye significativamente a la conductividad hidráulica en las raíces y hojas de *A. thaliana* (Maurel et al., 2008). En cambio, todas las proteínas vegetales PIP2 estudiadas han mostrado tener una alta eficiencia en el transporte de agua (Kumar et al., 2013). Las TIP son un grupo con 10 isoformas que se encuentran localizadas en las vacuolas líticas o de almacenamiento y en el retículo endoplásmico. El otro grupo denominado SIP se localiza principalmente en la membrana plasmática aunque también se han descrito en el retículo endoplasmático (Maurel et al., 2008). Las acuaporinas vegetales tienen un complejo

perfil de expresión, algunas de las cuales se expresan en todos los órganos y otras, en cambio, solo se expresan en ciertos tejidos o etapas del desarrollo (Maurel et al., 2008).

### I.5.3.1. Estructura de las acuaporinas

El análisis de la secuencia primaria muestra que la mayoría de estas proteínas son pequeñas MIP hidrófobas de 25-34 kDa (Chrispeels y Agre, 1994). Estructuralmente las acuaporinas están compuestas por seis hélices transmembrana (numeradas del 1 al 6) y cinco bucles (marcados de A a E); los extremos N- y C- terminales tienen su origen en el citoplasma (Figura 6) (Jung et al., 1994; Kruse et al., 2006). Los bucles B y E contienen un motivo Asn-Pro-Ala (NPA) altamente conservado en las acuaporinas que se encuentra incrustado en la membrana. Estos motivos interaccionan y da lugar al plegamiento del polipéptido (Jung et al., 1994), que causa la formación de un poro que permite el paso de moléculas a través de la membrana. Se ha demostrado que las acuaporinas animales, PIP microbianos y TIP se organizan en tetrámeros en la membrana plasmática, de modo que se forma una estructura con cuatro poros más uno adicional no funcional en el centro (Figura 6) (Chrispeels et al., 1999; Wallace y Roberts, 2004).



**Figura 6.** Estructura de las acuaporinas y organización en la membrana plasmática (modificado de Jung et al., 1994).

### I.5.3.2. Especificidad del transporte

La especificidad de sustrato de las acuaporinas puede explicarse por diferentes mecanismos de selección de moléculas entre los que se encuentran la exclusión de tamaño a nivel de dos grandes áreas de constricción del poro (Törnroth-Horsefield et al., 2006). Mientras que las PIP muestran una estructura de poro estrecha típica de un transporte específico de agua, otras como las NIP pueden transportar una gran variedad de moléculas (Wallace y Roberts, 2005). Se ha demostrado que algunas acuaporinas pueden transportar glicerol (Biela et al., 1999), urea (Eckert et al., 1999), amonio y metilamonio (Holm et al., 2005), ácido bórico (Takano et al., 2006), ácido láctico (Choi y Roberts, 2007), CO<sub>2</sub> (Uehlein et al., 2003) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert et al., 2007), entre otros.

## **I.6. HORMONAS VEGETALES**

Las plantas vasculares son organismos pluricelulares en los que es imprescindible la presencia de mecanismos que permitan una eficiente comunicación entre las diferentes células, tejidos y órganos.

Las hormonas vegetales son mensajeros químicos producidos en una célula que ejercen su efecto modulador en otra célula diferente que posee proteínas receptoras específicas. El desarrollo vegetal está controlado por seis tipos diferentes de hormonas: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico y brasinosteroides.

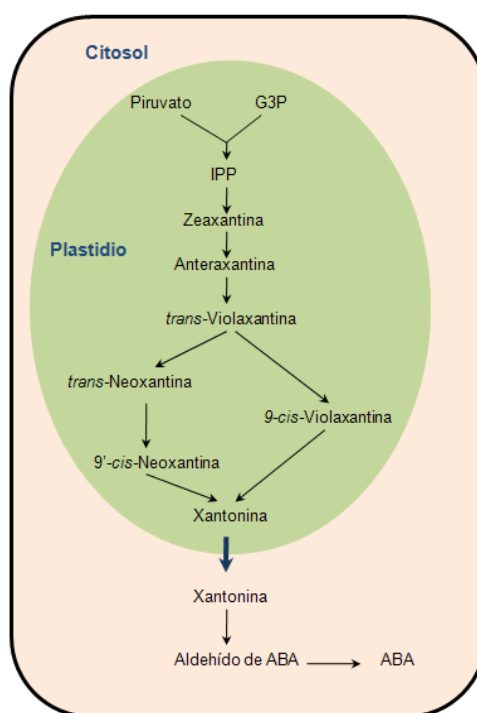
### **I.6.1. Ácido abscísico**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal descubierta en la década de los 60 del siglo pasado (Okhuma et al., 1963). Está presente en todas las plantas vasculares y también se encuentra en los musgos, y es producido por algunos hongos como metabolito secundario.

La primera función que se le asignó fue el control en la abscisión de las hojas y del letargo de las yemas. Actualmente se conoce que el ABA es un componente fundamental de las plantas frente a los estreses de tipo abiótico, como la sequía o el estrés salino, pues está descrito que esta hormona controla la conductividad hidráulica de la raíz (Zhang et al., 1995; Aroca et al., 2003; Ruiz-Lozano et al., 2009).

La biosíntesis de ABA comienza en los plastidios, siendo la molécula precursora el isopentenil fosfato (IPP) (Figura 7). Tras varias reacciones esta molécula se convierte en una xantofila, que posteriormente se transforma en violaxantina mediante una reacción catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa codificada por el gen *ABA1* en *A. thaliana*. La enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) cataliza la reacción de transformación de violaxantina o neoxantina en xantonina (Schwartz et al., 1997). Esta es la etapa considerada como limitante en la biosíntesis de ABA. La enzima NCED está codificada por una familia multigénica que varían en sus patrones de expresión según las etapas del desarrollo y en respuestas a diferentes tipos de estrés (Tan et al., 2003).

La xantonina es exportada de los plastidios al citosol donde se convierte en un aldehído de ABA por la acción de una alcohol reductasa de cadena corta. Por último, esta molécula es oxidada hasta ABA por la enzima ABA aldehído oxidasa (Cheng et al., 2002; Gonzalez-Guzman et al., 2004).



**Figura 7.** Ruta de biosíntesis de ABA (modificado de Taiz y Zeiger, 2010).

#### I.6.1.1. Rutas de transducción de la señal de ABA

El ABA interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos que se desarrollan a corto plazo, como la alteración del flujo de iones a través de la membrana

para el cierre estomático en situaciones de estrés. Además, también participa en otros procesos que se desarrollan en un periodo de tiempo más amplio, como es la dormición de las semillas. Ambas respuestas requieren mecanismos de amplificación y de transducción de la señal (Taiz y Zeiger, 2010).

La ruta de transducción de señales se inicia con la unión del ABA a unas proteínas ligando denominadas PYR/PYL/RCAR, que se encuentran tanto en el citosol como en el núcleo. Esta unión del ABA desencadena un cambio conformacional en estos receptores. La estructura ABA-receptor interacciona con una fosfatasa del tipo PP2C, que inhibe la fosforilación de la proteína SnRK, la cual modula la actividad de numerosos factores de transcripción (Hubbard et al., 2010; Hauser et al., 2011). La expresión de genes dependientes de ABA está regulada por la fosforilación de los factores de respuesta a ABA (ABFs/AREBs) (Park et al., 2009).

#### I.6.1.2. Papel del ABA en los estreses abióticos

Las plantas son organismos sésiles, por lo que han tenido que desarrollar mecanismos para percibir y responder rápidamente a los cambios que se producen en el ambiente. El ABA ha sido identificado como el principal regulador de la respuesta a diferentes tipos de estreses en las plantas vasculares (Hirayama y Shinozaki, 2007). Así, el ABA interviene en la respuesta a estreses abióticos como la sequía, salinidad, temperaturas extremas, etc. (Cutler et al., 2010; Miyakawa et al., 2013).

#### **I.6.2. Etileno**

El etileno es una hormona vegetal gaseosa, cuya estructura es un alqueno simple. Las principales funciones que desempeña en las plantas son el control de la senescencia y de la maduración de los frutos. La tasa de producción de etileno depende del tipo de tejido y del estadio de desarrollo (Abeles et al., 1992).

La síntesis de etileno comienza con la conversión del aminoácido metionina hasta S-adenosil-metionina, etapa que está catalizada por la enzima S-adenosilmetionina sintasa (AdoMet). La enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC sintasa) cataliza la conversión de S-adenosilmetionina hasta ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Liang et al., 1992), por último la 1-aminociclopropano-1-

carboxílico oxidasa (ACC oxidasa) cataliza la conversión de ACC a etileno (Kende, 1993). Las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa están codificadas por familias multigénicas que modifican sus patrones de expresión según el estado de desarrollo de las plantas y en respuesta a diferentes tipos de estreses tanto bióticos como abióticos (Chae y Kieber, 2005).

Los niveles de actividad de la enzima ACC sintasa regulan directamente los niveles de etileno en la planta. No obstante, se ha descrito que en tejidos con una elevada tasa de producción de etileno, como frutas en maduración, la actividad de la ACC oxidasa podría ser también limitante en la biosíntesis de etileno (Merchante et al., 2013).

#### I.6.2.1. Rutas de transducción de la señal de etileno

Los receptores de etileno actúan de modo contrario al resto de receptores de factores de crecimiento y hormonas, los cuales inducen normalmente respuestas por activación tras la unión a los ligandos. Sin embargo, las respuestas a etileno son reprimidas por los receptores o complejos de receptores cuando estos están activos (Hua y Meyerowitz, 1998).

En *Arabidopsis thaliana* el etileno es percibido por las proteínas receptoras ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 y EIN, situadas en la membrana del retículo endoplásmico. Estos receptores funcionan como reguladores negativos de la señalización de etileno. En ausencia de la hormona, los receptores activan a CTR1 (Bisson y Groth, 2010), este receptor activo suprime la respuesta a etileno mediante la inactivación de EIN2 a través de la fosforilación de su extremo C-terminal (Chen et al., 2010). En el núcleo, los factores de transcripción EIN3/EIL1 son degradados por la acción del proteasoma EBF1/2 (An et al., 2010). En ausencia de EIN3/EIL1 la transcripción de los genes de respuesta de etileno se reprime. En presencia de etileno, los receptores se unen a la hormona y se inactivan, estos a su vez, inactivan a CTR1. Esta inactivación impide la fosforilación del regulador positivo EIN2. El extremo C-terminal de EIN2 se escinde por un mecanismo desconocido y se desplaza hasta el núcleo, donde induce la degradación de EBF1/2 y se produce la estabilización de EIN3/EIL1. Los factores de transcripción EIN3 / EIL1 activan la expresión de los genes de respuesta a etileno (An et al., 2010).



Los componentes de señalización de etileno identificados en *arabidopsis* se conservan en las especies de plantas distantes evolutivamente, lo que sugiere que este mecanismo de señalización de etileno en las plantas es universal (Merchante et al., 2013).

\* \* \* \* \*

Como se ha descrito con anterioridad, la toxicidad de boro afecta negativamente al desarrollo normal de las plantas. Los objetivos principales de esta tesis doctoral fueron estudiar el efecto de la toxicidad de boro en el desarrollo del sistema radical y los mecanismos de respuesta en *Arabidopsis thaliana* para hacer frente a este tipo de estrés abiótico. En concreto, se han perseguido tres objetivos principales que se describen a continuación.

### **1. Análisis de genes afectados por la toxicidad de boro en las raíces de *A. thaliana***

Para identificar los genes de la raíz cuya expresión se modifica por la toxicidad de boro, se llevó a cabo un análisis transcriptómico en las plantas cultivadas con toxicidad en comparación con el del tratamiento control. Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos por los microarrays se realizaron estudios de expresión génica utilizando la técnica de la RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

### **2. Posible implicación del ácido abscísico en la respuesta a la toxicidad de boro**

Para este objetivo se utilizó el mutante *nced3* de *A. thaliana*, el cual no expresa el gen *NCED3* que codifica una enzima clave en la biosíntesis de ABA, dado que esta hormona está implicada en la respuesta a diferentes estreses abióticos. Se analizaron diferentes parámetros ecofisiológicos y bioquímicos en las plantas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*.

### **3. Análisis del transporte de agua en plantas estresadas por toxicidad de boro**

En relación con lo anterior, se estudió en ambos genotipos el efecto de la toxicidad de boro sobre el transporte de agua y la posible relación con los niveles de acuaporinas en las raíces. Para ello se llevó a cabo un análisis del flujo relativo de agua, así como un estudio de la expresión génica y del contenido proteico de las acuaporinas más abundantes en las raíces de *arabidopsis*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

## II.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los estudios realizados en este trabajo se llevaron a cabo tanto en las raíces como en los vástagos de plantas de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre (*Arabidopsis thaliana* L., var. Columbia) y mutante insercional *nced3* (línea GABI-Kat 129/B08) con número de identificación del stock N412308. También se utilizaron diferentes líneas de plantas transgénicas reporteras, cuyas características se detallan en la Tabla 2. Todas las semillas fueron adquiridas en el European Arabidopsis Stock Centre (NASC, <http://www.arabidopsis.info/>), excepto cuando se indica otra procedencia.

**Tabla 2.** Líneas reporteras utilizadas en este trabajo. Estas líneas se obtuvieron fusionando el gen reportero GUS con los promotores de los genes indicados.

Línea GUS	Gen	Descripción del gen
ACS11::GUS	At4g08040	<i>ACS11</i> , 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa
CASP4::GUS::GFP	At5g06200	<i>CASP4</i> , proteínas de la banda de Caspary

Las semillas transgénicas de la línea reportera CASP4::GUS::GFP fueron donadas por el Dr. Niko Geldner (Universidad de Laussane, Suiza).

### II.1.1. Cultivos hidropónicos

Las semillas fueron germinadas en bandejas con turba durante una semana y regadas en días alternos con agua desionizada de alta pureza (resistividad eléctrica de 18,2 MΩ cm), la cual siempre se utilizó en todos los experimentos de este trabajo. Tras dicho periodo las plántulas se extrajeron cuidadosamente de la turba, se lavaron con agua desionizada e inmediatamente se insertaron en unas planchas de poliestireno extruido para mantenerlas flotando en unos recipientes con 8 litros de medio nutritivo (Tabla 3), el cual se renovó dos veces por semana; mediante unas bombas se burbujeó aire para que las raíces estuvieran suficientemente oxigenadas. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de cultivo de ambiente controlado (Radiber, España), con fotoperiodo de día corto de 8 h/16 h luz/oscuridad, temperatura de 22 °C, humedad relativa del 65 %, y una intensidad lumínica de 120-150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de radiación fotosintéticamente activa. Tras 35 días de crecimiento, un grupo de plantas se sometió a un tratamiento de toxicidad con ácido bórico 5 mM y otro

grupo se cultivó en condiciones control con ácido bórico 10  $\mu\text{M}$ . Las plantas se mantuvieron con estos tratamientos de boro hasta su recogida a los tiempos indicados en cada experimento. Con este fotoperiodo de día corto se consiguió que las plantas de ambos tratamientos se mantuvieran en fase vegetativa durante todo el periodo de crecimiento.

**Tabla 3.** Composición de la solución nutritiva empleada para el cultivo hidropónico de las plantas de *arabidopsis*.

Compuesto	Concentración en el medio
$\text{KNO}_3$	1 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,75 mM
FeNa-EDTA	12,5 $\mu\text{M}$
NaCl	12,5 $\mu\text{M}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,5 $\mu\text{M}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5 $\mu\text{M}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,25 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,125 $\mu\text{M}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,05 $\mu\text{M}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	10 $\mu\text{M}$
El pH de la solución se ajustó a 5,7 con KOH 1 M	

### II.1.2. Cultivos *in vitro*

Las semillas se esterilizaron con hipoclorito sódico al 1 % (v/v) durante 10 minutos; a continuación se lavaron con agua estéril de alta pureza, se trataron con etanol absoluto dos veces y, finalmente, se lavaron con agua estéril seis veces.

Las semillas se sembraron en placas de Petri cuadradas (12 cm x 12 cm) que contenían 40 ml del medio nutritivo estéril (Tabla 3), al cual se le añadió Phytigel al 1 % (p/v) como agente gelificante y MES al 0,05 % (p/v) como tampón. Tras la siembra, las semillas se estratificaron a una temperatura de 4 °C durante cinco días para sincronizar la germinación. Finalmente, las placas se colocaron en posición vertical en una cámara de ambiente

controlado durante cinco días, con un régimen de 16 h/8 h luz/oscuridad, temperatura de 22 °C, humedad relativa del 75 %, y una intensidad lumínica de 120-150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa. Después de este periodo las plántulas se transfirieron a nuevas placas con medio de cultivo sólido con ácido bórico 10  $\mu\text{M}$  para el tratamiento control o suplementado con ácido bórico 5 mM para el de toxicidad. Las plantas se mantuvieron con estos tratamientos de boro hasta su recogida a los tiempos indicados en cada experimento.

## **II.2. RECOGIDA Y PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL**

### **II.2.1. Cultivos hidropónicos**

Transcurrido el tiempo de los diferentes tratamientos, las plantas se recogieron de la siguiente forma. Se retiró la planta entera del cultivo hidropónico, se lavó la raíz mediante inmersión en agua desionizada con el fin de eliminar los restos de la solución nutritiva, y se separaron el vástago y la raíz con la ayuda de un bisturí. Inmediatamente ambas partes se secaron con toallas de papel, se introdujeron en sobres de aluminio debidamente etiquetados y se sumergieron en nitrógeno líquido. Las muestras se trituraron con un mortero y una maza previamente enfriados con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que se distribuyó en viales según las cantidades necesarias para cada tipo de análisis, y se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **II.2.2. Cultivos *in vitro***

Tras el tiempo de los distintos tratamientos se separaron las raíces de los vástagos con la ayuda de un bisturí. Con unas pinzas se retiraron las raíces del medio de cultivo sólido, se lavaron con agua desionizada para eliminar los posibles restos de medio de cultivo, se secaron con toallas de papel y se introdujo cada parte (vástago y raíz) en viales independientes que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Por último, se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

La trituración de las muestras para llevar a cabo los análisis se realizó del siguiente modo. En cada uno de los viales que contenía el material vegetal congelado se introdujeron dos pequeñas bolas de acero inoxidable, y estos viales se colocaron en un molino vibratorio (Retsch, Alemania) dentro de unas cajas térmicas, previamente enfriadas a  $-80^\circ\text{C}$  para que las muestras se mantuvieran congeladas durante la trituración. Las muestras se molieron hasta

obtener un polvo fino y, seguidamente, se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de los análisis.

### **II.3. EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

#### **II.3.1. Extracción y manipulación del DNA genómico**

Para la extracción del DNA genómico se utilizó un tampón de extracción que contenía: CTAB 60 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,0),  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  20  $\mu\text{M}$  y NaCl 1,1 M.

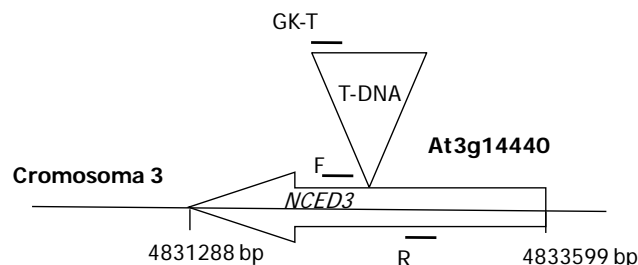
Se recogió una hoja de cada planta de arabis, se introdujo en un vial de 2 ml, y se le añadió una pequeña cantidad de arena fina al vial. Seguidamente se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del tampón de extracción y se trituró la hoja; una vez triturada, se añadieron otros 400  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción y los viales se colocaron en un bloque térmico a  $60\text{-}65^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Tras la incubación, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v) a cada vial y se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 g. A continuación se recogió el sobrenadante en nuevos viales de 1,5 ml, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se volvieron a centrifugar durante 10 minutos a 12.000 g. En el siguiente paso se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pella durante unos minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente, se lavó con etanol al 70 % (v/v), se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pella a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se resuspendió el precipitado en 100  $\mu\text{l}$  de agua estéril de alta pureza.

##### **II.3.1.1. Genotipado del mutante insercional *nced3* por PCR**

Se realizaron dos tipos de PCR con el objetivo de identificar mutantes insercionales homocigóticos (Esquema I):

1. En la primera de ellas se intentó amplificar el DNA genómico de la planta con los cebadores específicos del gen *NCED3* (F/R), diseñados en las regiones que flanquean el lugar de la posible inserción del T-DNA. Si en esta primera PCR se obtenía una amplificación significaba que la planta de la que procedía el DNA genómico no podía ser mutante homocigótico; en cualquier caso sería silvestre (acigoto) o hemicigótico. Solo a las muestras de las que no se obtuvieron amplificaciones se les realizó la segunda PCR, ya que al poseer la inserción del T-DNA en ambos alelos el fragmento era demasiado grande para poder ser amplificado por la Taq DNA polimerasa.

2. En la segunda PCR las muestras de DNA genómico de los posibles mutantes homocigóticos se amplificaron combinando los cebadores específicos del gen *NCED3* (F/R) con el cebador GK-T específico de la secuencia del T-DNA. Si en esta PCR se obtenía amplificación se tendría un mutante homocigótico.



**Esquema I.** Detalle de la inserción del T-DNA en el gen *NCED3*.

Para la realización de las PCR se utilizaron los reactivos según la Tabla 4.

**Tabla 4.** Reactivos empleados para la realización de las PCR.

Compuesto	Volumen	Concentración final
Tampón 10x	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µl	2 mM
Parejas de cebadores (F/R, F/GK-T o R/GK-T) 10 µM	2 µl	0,2 µM
dNTP 10 mM	1 µl	0,2 mM
Taq polimerasa 5 U/µl	0,2 µl	1 U
Agua estéril de alta pureza	37,8 µl	
DNA genómico	2 µl	

A continuación las muestras se introdujeron en un termociclador (Bio-Rad, modelo MyiQ®) con el siguiente programa:

94 °C durante 3 minutos

94 °C durante 30 segundos	} x 40 veces
55 °C durante 45 segundos	
72 °C durante 1 minuto	

72 °C durante 5 minutos

4 °C durante 5 minutos

Los productos de la PCR se visualizaron en un gel mediante electroforesis. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1,5 % (p/v) en TAE (1x) [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), acetato sódico 20 mM y EDTA 1 mM], se mezcló bien y se calentó hasta que la agarosa estuvo disuelta. Una vez que la solución estuvo atemperada se le añadieron 2 µl de bromuro de etidio (5 mg/ml) y se dejó solidificar; mientras se preparaba el gel se le añadieron 5 µl de tampón de carga 6x a cada vial con muestra. Posteriormente se colocó dicho gel en la cubeta de electroforesis, que también se llenó con TAE (1x), se cargaron las muestras de DNA en el gel y se le aplicó un voltaje de 70 V durante 20-30 minutos. Finalmente, se visualizó el resultado de la amplificación mediante la exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador Bio-Rad Gel Doc 2000.

El tampón de carga 6x para la electroforesis de DNA contenía azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilenocianol 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v) en agua de alta pureza.

Los cebadores empleados para el genotipado del mutante *nced3* fueron GK-T: ATATTGACCATCATACTCATTGC, F (forward): GAGCTGCAGCCGGTATAGTC, y R (reverse): CGACGTCCGGTGATTTAGTT.

### II.3.2. Extracción y manipulación de RNA

#### II.3.2.1. Extracción de RNA

Debido a la alta labilidad del RNA, durante su extracción y manipulación se trabajó utilizando guantes, material esterilizado y soluciones tratadas con el inhibidor de RNAasa dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1 % (v/v) (Sambrook et al., 1989).



La extracción del RNA se realizó mediante el método Tri-Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, EE.UU.). Se partió de 100 mg del material finamente triturado y conservado a -80 °C en viales de 2 ml. Cada vial se homogeneizó con 1 ml del reactivo Tri-Reagent<sup>®</sup>, se agitaron con un vórtex durante 1 minuto y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 200 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) a cada vial, se agitaron vigorosamente mediante vórtex durante 15 segundos, se dejaron reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, se centrifugaron a 13.000 g (15 minutos a 4 °C). Tras la centrifugación, el sobrenadante acuoso donde se encuentra el RNA se trasvasó a viales nuevos de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de isopropanol a cada uno para precipitar el RNA. Los viales se mantuvieron en frío a -20 °C durante 1-2 h y se centrifugaron a 13.000 g (20 minutos a 4 °C). A continuación se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75 % (v/v) para lavar el RNA precipitado. Los viales se centrifugaron a 13.000 g (10 minutos a 4 °C), se retiró el etanol y se dejó secar la pella a 37 °C. Finalmente, se resuspendió el RNA en 87,5 µl de agua de alta pureza tratada con DEPC.

Una vez extraído el RNA se realizó una electroforesis con el fin de analizar su calidad. Las cubetas de electroforesis utilizadas para el fraccionamiento del RNA total se trataron previamente con una solución que contenía SDS 1 % (p/v) y NaOH 0,1 M. Se preparó un gel de agarosa al 1,5 % (p/v), disuelto en TAE (1x), se mezcló bien y se calentó hasta que la agarosa quedó disuelta. Una vez que se hubo atemperado, se dejó solidificar y a continuación se colocó dicho gel en la cubeta de electroforesis, que también se llenó con TAE (1x). Posteriormente, de cada una de las muestras de RNA se realizó una dilución 1/5, a cada una de las cuales se le añadieron 5 µl de solución desnaturizante y se mezcló bien; seguidamente se colocaron las muestras a 67 °C durante 10 minutos y, a continuación, estuvieron 1 minuto en hielo con el objetivo de que el RNA se desnaturalizara. Se cargaron las muestras de RNA en el gel y se le aplicó un voltaje de 70 V durante 20-30 minutos. Finalmente se visualizó el RNA fraccionado mediante la exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador Bio-Rad Gel Doc 2000.

La composición de la solución desnaturizante fue la siguiente:

- Formamida desionizada (76 %, v/v). Para ello se mezcló N-N-dimetil-formamida con la resina de intercambio iónico AG 501-X8(D) de Bio-Rad a una concentración final del 1 % (p/v). La mezcla se mantuvo en agitación

durante 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente la resina se eliminó por filtración. La solución desionizada se almacenó a -20 °C.

- Formaldehído (7,6 %, v/v).
- MOPS (10x) (7,6 %, v/v). Para ello se preparó MOPS 4 M y se ajustó el pH a 7,0 con HCl.
- Tampón de carga para RNA 5x (7,6 %, v/v). Estaba compuesto por glicerol 50 % (v/v), EDTA 1 mM y azul de bromofenol 0,25 % (p/v).
- Bromuro de etidio (1 mg/ml) (1 %, v/v).

Tras comprobar que no había degradación, se realizó una digestión con DNAasa para eliminar los posibles restos de DNA genómico. Para ello las muestras de RNA se trataron con 12 unidades (U) de DNAasa (Qiagen) en un volumen final de 100 µl durante 30 minutos a 25 °C. Posteriormente se llevó a cabo la purificación de las muestras mediante columnas Zymo-Spin<sup>®</sup> (Zymo Research, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. El RNA se eluyó de las columnas con 18 µl de agua libre de RNAasa.

Seguidamente se comprobó por PCR que las muestras de RNA estaban totalmente libres de DNA genómico. Para ello se utilizó 1 µl de cada solución de RNA en un volumen final de 50 µl, que contenía: MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,2 mM, tampón de la enzima Taq DNA polimerasa (Ecotaq) 1x, cebadores F y R del gen *CLA* 0,2 µM (Tabla 5) y 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Ecotaq). Se empleó el siguiente programa para llevar a cabo la amplificación por PCR:

94 °C durante 5 minutos	
94 °C durante 30 segundos	} x 40 veces
60 °C durante 30 segundos	
72 °C durante 60 segundos	
72 °C durante 5 minutos	
4 °C durante 5 minutos	

Para la observación de los productos de la amplificación se procedió como se describe en el apartado II.3.1.1.

En aquellas muestras en las que se observó la presencia de contaminación con DNA genómico (producto de amplificación de 355 pb), se repitió el tratamiento con DNAasa, la purificación con columnas y la comprobación por PCR hasta que no se detectó contaminación.

Asimismo, se determinó mediante Nanodrop la cantidad y calidad del RNA total midiendo la absorbancia de las muestras a 260 nm y a 280 nm. Se consideró que la calidad del RNA era buena cuando el cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm tuvo un valor comprendido entre 1,8 y 2,0.

#### II.3.2.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Una vez comprobada la ausencia de DNA genómico en las muestras como se ha descrito en el apartado anterior, se procedió a la retrotranscripción del RNA para la síntesis del cDNA. Para ello se utilizaron 2 µg de RNA a los que se añadieron oligo dTT18 1 µM y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 12 µl. A continuación las muestras se incubaron a 72 °C durante 5 minutos en un termociclador y luego se bajó la temperatura hasta 12 °C a razón de 1 °C cada 10 segundos. Finalmente las muestras se colocaron en hielo durante 10 minutos.

Seguidamente se añadieron: tampón de la enzima retrotranscriptasa 1x, dNTP 1 mM y 6 U de la enzima retrotranscriptasa MMLV (New England Biolabs, EE.UU.) hasta un volumen final de 20 µl; esta mezcla se mantuvo durante 90 minutos a 42 °C. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción inactivando la enzima a 90 °C durante 10 minutos. A continuación, las muestras se incubaron a 4 °C durante 5 minutos y, finalmente, el cDNA se almacenó a -20 °C.

Una vez sintetizado el cDNA se comprobó su correcta síntesis mediante PCR utilizando el programa descrito en el apartado II.3.2.1. Para ello se utilizó 1 µl del cDNA sintetizado en un volumen final de 50 µl, que contenía: MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,2 mM, cebadores L y R del gen *CLA* de arabidopsis 0,2 µM (Tabla 5), tampón de la enzima Taq DNA polimerasa (Ecotaq) 1x, y 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Ecotaq).

Los cebadores seleccionados para el gen *CLA* de arabidopsis se diseñaron a partir de las secuencias de dos exones distintos del extremo 3' de dicho gen. Debido a que el producto de la PCR que utiliza el cDNA como molde fue de tamaño inferior (196 pb *CLA*) al obtenido a

partir del DNA genómico (355 pb *CLA*), se pudo comprobar la eficiencia de la síntesis de cDNA y la ausencia de posibles contaminaciones con DNA genómico.

El cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado de las muestras de vástagos y raíces de las plantas de *arabidopsis* se utilizó para analizar la expresión de diversos genes. Para ello se empleó la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR a tiempo real).

### II.3.2.3. Diseño de cebadores para la Q-RT-PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de los distintos genes fue necesario el diseño de cebadores específicos (Tabla 5). Los cebadores utilizados en este trabajo se diseñaron a partir de la secuencia de los genes correspondientes de *arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org/>) y con la ayuda del programa PRIMER3 ([http://biocore.unl.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://biocore.unl.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Para el diseño de los cebadores se siguieron los criterios de Czechowski et al. (2005) y Udvardi et al. (2008).

**Tabla 5.** Cebadores utilizados en este trabajo.

Gen	Descripción del gen	Cebadores (5' - 3')	Tamaño del amplicón
At4g24550	Clatrina ( <i>CLA</i> )	F: AGCATACACTGCGTGCAAAG R: TCGCCTGTGTACATATCTC	196 pb
At3g55000	Función de organización tubular ( <i>TONIA</i> )	F: TGTGAGGGATGGAACAAATG R: AACGCAGTTGCAAATAAAGGA	136 pb
At3g14440	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa ( <i>NCED3</i> )	F: TCTGTTTCGTTACGACGAG R: GGAACCCTTGACGGAAGTTT	103 pb
At4g26080	Implicado en la señalización de ABA ( <i>ABI1</i> )	F: TGTCAAAGCTGGCGATACAG R: ACCCTCTCGCCTCAGTTCA	113 pb
At5g57050	Implicado en la señalización de ABA ( <i>ABI2</i> )	F: GGCTCGGAAACGGATTTTAC R: TGCTGCAGGATCTTTTCCTT	100 pb
At4g08040	1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa ( <i>ACS11</i> )	F: GCCGAGCATTCTTTATGGAC R: CCATAGCAACCTCCATCGTT	142 pb
At5g03280	Implicado en la señalización por etileno ( <i>EIN2</i> )	F: ACGTTCTCAACCGCCTACAG R: TGAAGTCGGA CTGCTCTCT	118 pb
At2g36100	Implicado en la síntesis de la banda de Caspary ( <i>CASPI</i> )	F: TTTGTGGCTTTGTGTAACATGAG R: TCAGAAGCTTTTAAGTTGAACCAA	114 pb

At3g11550	Implicado en la síntesis de la banda de Caspary ( <i>CASP2</i> )	F: CATGGCCTTGTGAATTGTGT R: AGAAAAGCAGAGCTACAATCACACT	75 pb
At2g27370	Implicado en la síntesis de la banda de Caspary ( <i>CASP3</i> )	F: GAAAACCTTGGATTGATCCTCTTG R: AAACCCGAGTTACCAAACACA	120 pb
At5g06200	Implicado en la síntesis de la banda de Caspary ( <i>CASP4</i> )	F: ATTTGGCACACAATGGGAAT R: ACCGGAGATAACGACAAGGA	143 pb
At5g15290	Implicado en la síntesis de la banda de Caspary ( <i>CASP5</i> )	F: TTGCCATTGTCCTCCTCATT R: CACACCAAACCATGCATTTC	133 pb
At3g61430	Acuaporina ( <i>PIP1;1</i> )	F: CTGGCCTTGTCTCTTAGTTGCTTC R: TCTCCTTTGGAACCTCTTCCTTG	126 pb
At2g45960	Acuaporina ( <i>PIP1;2</i> )	F: TCCTCTTCTTTGCCTAATGGAGAC R: AGTTGCCTGCTTGAGATAAAC	132 pb
At3g53420	Acuaporina ( <i>PIP2;1</i> )	F: TGTGTTTTCCACTTGCTCTTTTG R: CACAACGCATAAGAACCTCTTTGA	120 pb
At2g37170	Acuaporina ( <i>PIP2;2</i> )	F: GGCAACTTTGCTTGTA AAACTATGC R: AGTACACAAACATTGGCATTGG	102 pb

#### II.3.2.4. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR a tiempo real)

Los análisis de expresión se realizaron en un instrumento para PCR cuantitativa a tiempo real (MyiQ<sup>®</sup>, Bio-Rad, EE.UU.), en un volumen final de 25 µl, a partir de 1 µl de la solución de cDNA sintetizado previamente y utilizando el kit iQSYBRGreen (Bio-Rad).

Se realizó de forma independiente una recta de calibrado para el gen de referencia y para el gen cuya expresión se quiso analizar. Para ello se utilizaron diluciones seriadas de una de las muestras de cada experimento. De esta forma los resultados obtenidos fueron referidos a ese patrón interno. El gen de referencia utilizado fue *TONIA* (Tabla 5).

Se utilizó el siguiente programa para la Q-RT-PCR a tiempo real:

95 °C durante 10 minutos	
95 °C durante 15 segundos	} x 40 veces
60 °C durante 30 segundos	
72 °C durante 10 segundos	
95 °C durante 1 minuto	

73 °C durante 30 segundos.

Para comprobar que en las Q-RT-PCR a tiempo real se obtenía un único producto de amplificación se llevaron a cabo curvas de punto de fusión. Para ello se sometieron las muestras a un incremento de temperatura desde 73 °C hasta 95 °C a una velocidad de 0,05 °C s<sup>-1</sup>.

4 °C durante 5 minutos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software MyiQ Single-Color (Bio-Rad).

## **II.4. ARQUITECTURA RADICAL Y ANÁLISIS FOLIAR**

### **II.4.1. Análisis de la arquitectura radical**

Todas las imágenes del sistema radical fueron tomadas directamente de las plantas en crecimiento en las placas de Petri, utilizando para ello un escáner de sobremesa (resolución 200 dpi). Para analizar la morfología de la raíz se utilizó el software Optimas versión 6.1 (Media Cybernetics, EE.UU.). La longitud de la raíz principal y de las raíces laterales, así como el número de raíces laterales, se determinaron manualmente. Todos los datos fueron exportados a un archivo Excel para su procesamiento final.

Las longitudes de la raíz principal y de las raíces laterales se expresaron en centímetros. La densidad de raíces laterales se calculó como el número de raíces laterales dividido por la longitud de la raíz principal.

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 20 plantas independientes. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces y todos los resultados fueron analizados estadísticamente usando el test de *t*-Student.

### **II.4.2. Análisis del área de la roseta**

Se utilizaron plantas cultivadas durante 35 días en hidroponía, las cuales presentaban un sistema foliar totalmente desarrollado. Se recogieron cinco plantas, se separaron las hojas del vástago, e inmediatamente se colocaron con cinta adhesiva sobre un fondo blanco para ser escaneadas con un escáner de sobremesa.

Para el cálculo del área foliar las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ (Wayne Rasband, NIH). El área de la roseta se expresó como la suma de las áreas de todas las hojas de la roseta, medida en  $\text{cm}^2$ .

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de los análisis de cinco plantas independientes. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces y todos los resultados fueron analizados estadísticamente usando el test de *t*-Student.

## **II.5. ANÁLISIS HISTOQUÍMICO**

### **II.5.1. Tinciones GUS**

Para el análisis histoquímico de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de las líneas GUS, las plántulas transgénicas fueron fijadas con acetona fría al 80 % (v/v) durante 10 minutos y a continuación se realizaron tres lavados con tampón fosfato 50 mM (pH 7,0). Posteriormente se les añadió un volumen de 5 ml de la solución de tinción, que contenía: X-Gluc 2 mM, DMF al 1 % (v/v), Triton-X 100 al 0,5 % (v/v),  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  10 mM, tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), ferricianuro potásico 1 mM y ferrocianuro potásico 1 mM.

Las plántulas se incubaron a 37 °C durante un tiempo determinado según los niveles de expresión del promotor fusionado a la construcción GUS. Finalmente, la solución de tinción fue reemplazada por etanol al 20 % (v/v) para detener la tinción.

Las plántulas se analizaron mediante un microscopio Leica S8APO Stereozoom equipado con una cámara digital (Leica EC3) y para obtener las imágenes se empleó el software LAS EZ (Leica, Heerbrugg, Suiza). Para cada línea transgénica y cada tratamiento se examinaron al menos 10 plántulas y se eligieron las imágenes más representativas.

### **II.5.2. Clarificación de las raíces para la visualización de la banda de Caspary**

La clarificación de las raíces se realizó según el método de Naseer et al. (2012) con algunas modificaciones. Las plántulas se retiraron del medio de cultivo *in vitro* tras 48 horas de tratamiento con toxicidad de boro y entonces se incubaron a 57 °C durante 15 minutos en una solución que contenía HCl 0,24 M en metanol al 20 % (v/v). A continuación la solución fue reemplazada por otra con NaOH al 7 % (p/v) en etanol al 60 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente fueron hidratadas durante 5 minutos en etanol al 40 %, 20 %, 10 % (v/v) y, finalmente, infiltradas durante 15 minutos en una solución de etanol al 5

% (v/v) y glicerol al 25 % (v/v). Las raíces se montaron en glicerol al 50 % (v/v) para la visualización de la banda de Caspary, la cual se consiguió mediante un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop, equipado con una cámara digital, utilizando una longitud de onda de excitación de 770 nm y detectando la señal entre 500 y 550 nm. Para cada tratamiento se examinaron al menos 10 plántulas y se eligieron las imágenes más representativas.

### **II.5.3. Análisis de las líneas reporteras GFP**

Las plántulas transgénicas se retiraron directamente de las placas de cultivo *in vitro* y se montaron en agua desionizada sobre un portaobjetos. A continuación las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y detectando la señal entre 505 y 530 nm. Para cada tratamiento se examinaron al menos 10 plántulas y se eligieron las imágenes más representativas.

### **II.5.4. Localización histoquímica del anión superóxido**

Tras el tratamiento de toxicidad de boro, las raíces de plantas cultivadas hidropónicamente se incubaron durante 15 minutos en oscuridad en una solución de dihidroetidio 10  $\mu$ M en  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu$ M (pH 4,75). Seguidamente se lavaron tres veces con agua desionizada y se montaron sobre un portaobjetos para ser visualizadas con un microscopio de fluorescencia; la longitud de onda de excitación fue de 535 nm y se detectó la señal a 635 nm. Para cada tratamiento y genotipo se examinaron al menos 10 plantas y se eligieron las imágenes más representativas.

## **II.6. ANÁLISIS DE PARÁMETROS ECOFISIOLÓGICOS**

Se utilizaron plantas cultivadas en medio hidropónico en condiciones de día corto (8 horas de luz), 22 °C y 65 % de humedad relativa. Bajo estos parámetros las plantas desarrollan hojas de gran tamaño que facilitan la toma de medidas.



### II.6.1. Determinación de la tasa de fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y concentración interna de CO<sub>2</sub>

Las mediciones de tasa fotosintética (Pn), transpiración (E), conductancia estomática (g<sub>s</sub>) y concentración interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) se realizaron mediante un analizador de gases por infrarrojos LiCor 6400 (Biosciences, EE.UU.) al que se le acopló una pinza especial para hojas pequeñas de 1 cm de diámetro de ventana (Arabidopsis Chamber 6400-15, LiCor). El caudal de aire utilizado fue de 350 µmol s<sup>-1</sup> y la intensidad lumínica de 120-150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de radiación fotosintéticamente activa.

Las medidas se hicieron una hora después del inicio del fotoperiodo en hojas totalmente expandidas de 10 plantas diferentes por cada tratamiento.

### II.6.2. Medida de la abertura estomática

Se seleccionó una hoja totalmente expandida a la que se aplicó una fina capa de esmalte de uñas transparente en la superficie abaxial de la hoja, se esperó a que seca el esmalte, se cubrió la zona con cinta adhesiva y se procedió a la separación de la epidermis –la cual queda adherida a la cinta adhesiva– del resto de la hoja. Las imágenes de los estomas se obtuvieron con un microscopio de campo claro Zeiss Axioskop y se analizaron con el software ImageJ (Wayne Rasband, NIH). La abertura estomática se expresó como el ancho del poro dividido por la longitud de este. Se seleccionaron las hojas de al menos cinco plantas diferentes y por cada hoja se analizaron al menos 25 estomas.

### II.6.3. Medida de la fluorescencia de las clorofilas

Los parámetros de la fluorescencia de las clorofilas se midieron en hojas completamente expandidas con la ayuda de un fluorímetro (LiCor 6400 XT, EE.UU.). En plantas aclimatadas a la oscuridad durante la noche se determinó la fluorescencia mínima (F<sub>0</sub>) utilizando luz modulada a muy baja intensidad (< 1 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). La fluorescencia máxima (F<sub>m</sub>) se registró tras aplicar un pulso de luz de intensidad saturante (> 6.000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 0,8 segundos. La fluorescencia variable se calculó a partir de la expresión  $F_v = F_m - F_0$ . Posteriormente, en plantas aclimatadas a condiciones de luz se aplicó un pulso de luz de intensidad saturante (> 6.000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 0,8 segundos y se calculó F<sub>m</sub>'. A continuación la luz actínica se apagó y se irradió con luz de infrarrojo lejano para calcular

$F_0'$ ,  $F_v'$  y  $F_s$ , siendo esta última la fluorescencia basal de la hoja. El rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ), que se define como la fracción de fotones absorbidos que son utilizados en las reacciones fotoquímicas, se calculó según la ecuación  $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$  (Genty et al., 1989). Para cada tratamiento se determinó la fluorescencia de al menos cinco plantas diferentes.

## **II.7. ANÁLISIS DE LA TRANSLOCACIÓN DE AGUA**

Para determinar la translocación de agua desde la raíz a las hojas se utilizó deuterio como elemento traza según el método descrito por Da Ines et al. (2010). Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Helmholtz Zentrum, Institute of Biochemical Plant Pathology, en Múnich (Alemania). Las plantas de *arabidopsis* se cultivaron en 15 litros de medio hidropónico en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones: 16 h/8 h luz/oscuridad, 22 °C, 65 % de humedad relativa y bajo una intensidad lumínica de 450-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa.

Tras 20 días de crecimiento, un grupo de plantas se sometió a un tratamiento de toxicidad con ácido bórico 5 mM y otro grupo se cultivó en condiciones control con ácido bórico 10  $\mu\text{M}$ . A cada 15 litros de medio hidropónico se añadió 1 ml de una solución de  $\text{D}_2\text{O}$  al 90 % de pureza, y se tomaron muestras de 1 ml del medio deuterado directamente de los tanques de cultivo a los tiempos 0, 40 minutos, 2 h, 3, 8 y 24 h. También se analizó el contenido de agua deuterada en las rosetas de las plantas a los siguientes tiempos (tres rosetas por cada tiempo): 0, 20, 40, 60, 80, 100 minutos, 2 h, 3, 8 y 24 h. Para la toma de muestra de las plantas, se cortó la roseta entera, se introdujo rápidamente en frascos de vidrio que se congelaron con nitrógeno líquido para evitar la evaporación y se almacenaron a -20 ° C hasta la extracción del agua para el análisis isotópico.

El vapor de agua atmosférico también se recogió para medir su contenido de deuterio. El aire de la cámara era bombeado a través de una trampa de congelación de humedad que se encontraba sumergida en hielo seco.

El agua de las hojas de la roseta se extrajo mediante destilación al vacío criogénico. Los tubos que contenían las hojas se congelaron en nitrógeno líquido durante aproximadamente 10 minutos y se fijaron en un dispositivo de destilación criogénica. El sistema estaba aislado y conectado a una bomba de vacío. Los tubos se calentaron con un dispositivo de calefacción y la totalidad del agua de las hojas se recogió en tubos sumergidos en nitrógeno líquido. Los

tubos que contenían el agua extraída se almacenaron a -20 °C hasta la realización del análisis isotópico. La relación de isótopos de hidrógeno (D/H) de las muestras de agua se determinó mediante espectrometría de masas (Delta-S, Finnigan MAT, Alemania) y se expresó en partes por mil:

$$\delta D = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1 / 1000]$$

donde R es la respectiva relación D/H respecto a la media del agua del océano Viena-Standard (V-SMOW) (la relación absoluta D/H es 0,00015576). Las mediciones  $\delta D$  de muestras de agua tienen una precisión de  $\pm 1$  ‰.

Las curvas de la cinética de absorción de deuterio y las curvas modeladas a partir de los valores reales de absorción se obtuvieron según el método descrito por Da Ines et al. (2010).

El flujo relativo de agua ( $q_{\text{hoja}}$ ) se dedujo mediante el análisis de regresión de la fase inicial (0-120 minutos) de los datos modelados de absorción de deuterio, a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{a} \cdot \ln \left( \frac{R_{\text{hoja},0} - R_{\text{hoja},SS}}{R_{\text{hoja}}(t) - R_{\text{hoja},SS}} \right) = q_{\text{hoja}} \cdot t$$

donde

$q_{\text{hoja}}$  : flujo relativo de agua

$t$  : tiempo

$R_{\text{hoja},0}$  : ratio molar isotópico de la hoja inicial

$R_{\text{hoja}}(t)$  : ratio molar isotópico de la hoja a tiempo  $t$  tras añadir deuterio

$R_{\text{hoja},SS}$  : ratio molar isotópico de la hoja en el estado estacionario

$a$  viene determinado por la ecuación:

$$a = \frac{\left( \frac{1}{\alpha_{eq}} \right) \cdot (1 - p)}{\alpha_{kin} (1 - rH)} + p$$

donde

$\alpha_{eq}$  : factor de fraccionamiento isotópico de equilibrio (1,0828 a 22 °C)

$\alpha_{kin}$  : factor de fraccionamiento isotópico cinético (1,025)

$p$  : factor de fraccionamiento del agua recirculada al floema (autoajuste)

$rH$  : humedad relativa de la atmósfera (65 %)

## **II.8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE DIVERSOS IONES Y METABOLITOS**

### **II.8.1. Extracción y determinación del boro soluble e insoluble**

Para las determinaciones de boro se partieron de 200 mg de material vegetal previamente triturado y almacenado en viales con tapón de rosca a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La extracción del boro soluble se realizó en dos pasos consecutivos añadiendo en cada uno 500  $\mu\text{l}$  de agua desionizada a los viales y calentándolos a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; además, cada 10 minutos se agitaron los viales con un vórtex. Después de cada extracción, los viales se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g y los sobrenadantes se recolectaron en un nuevo vial, de manera que el volumen final del extracto acuoso fue de 1 ml. Los extractos acuosos se emplearon para la determinación del boro soluble y los precipitados para la del boro insoluble, y ambos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta las correspondientes determinaciones.

Antes de proceder al análisis del contenido en boro, tanto los extractos acuosos como los precipitados se transfirieron a crisoles de porcelana y se calentaron en una mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas. Una vez que los crisoles estuvieron a temperatura ambiente, sus cenizas se disolvieron con 1 ml de HCl 0,1 M.

El contenido de boro se analizó mediante el método de la azometina-H. Para ello se preparó una solución enmascarante que contenía 25 g de acetato de amonio disueltos en 50 ml de agua desionizada y 12,5 ml de ácido acético glacial. Seguidamente se añadieron 0,67 g de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  y, por último, 0,6 ml de ácido tioglicólico al 80 % (p/p).

El reactivo de la azometina-H se preparó por disolución de 0,45 g de este compuesto y 1 g de ácido ascórbico en 50 ml de agua desionizada.

A los viales con 200  $\mu\text{l}$  de los extractos ácidos se les añadieron 200  $\mu\text{l}$  de la solución enmascarante y 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de la azometina-H. Después los viales se agitaron vigorosamente y se mantuvieron en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, los viales se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g y se midió la absorbancia del sobrenadante a 410 nm. El contenido de boro se cuantificó interpolando los valores de absorbancia de las muestras en una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de ácido bórico.

### II.8.2. Extracción y determinación de iones solubles

Para los análisis de aniones y cationes se partieron de 100 mg de material vegetal previamente triturado y almacenado en viales con tapón de rosca a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La extracción se realizó en dos pasos consecutivos añadiendo en cada uno 500  $\mu\text{l}$  de agua desionizada a los viales y calentándolos a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; además, cada 10 minutos se agitaron los viales con un vórtex. Después de cada extracción los viales se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g y los sobrenadantes se recolectaron en un nuevo vial, de manera que el volumen final del extracto acuoso fue de 1 ml.

Para determinar las concentraciones de aniones y cationes, 25  $\mu\text{l}$  de los extractos se pasaron a través de un filtro de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  y se inyectaron en un cromatógrafo iónico Dionex ICS-1000 (Sunnyvale, EE.UU.). En la determinación de aniones se utilizó una columna Ionpac AS9-HC (4 x 250 mm) con una pre-columna AG9-HC (4 x 50 mm) y una supresora CSRS300-4mm. El caudal de la fase móvil fue de  $1,5\text{ ml min}^{-1}$  y se utilizó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  9 mM como eluyente. Para determinar las concentraciones de cationes se empleó una columna Ionpac CG12A (4 x 250 mm) con una precolumna CS12A (4 x 50 mm) y una supresora ASRS 300-4mm. El caudal de la fase móvil fue de  $1\text{ ml min}^{-1}$  y el eluyente ácido metanosulfónico 20 mM.

La concentración de los aniones  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y de los cationes  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  se calculó con el programa de cromatografía Chromeleon/Peaknet 6.50 por comparación de las áreas de los picos con patrones conocidos.

### II.8.3. Extracción y determinación de carbohidratos solubles

Para esta determinación se partieron de 100 mg de tejido finamente triturado y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en viales de 1,5 ml con tapón de rosca, y la extracción se realizó en cuatro etapas:

- En un primer paso se añadió a cada vial 1 ml de etanol al 80 % (v/v) tamponado con HEPES-KOH 5 mM (pH 7,5) y se incubó a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; cada 10 minutos se agitaron los viales. Transcurrido el tiempo, los viales se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g y se retiró el sobrenadante a viales nuevos.

- En un segundo paso, se repitió el anterior y los sobrenadantes se recolectaron en los mismos viales nuevos que en el primer paso.
- A continuación, se añadió 1 ml de etanol al 50 % (v/v) tamponado con HEPES-KOH 5 mM (pH 7,5) a cada precipitado y a partir de ese momento se repitió el primer paso.
- Finalmente, se añadió un 1 ml de agua desionizada a cada precipitado y a partir de entonces se repitió el primer paso y los sobrenadantes se recolectaron obteniendo finalmente 4 ml de extracto para cada muestra, los cuales se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los análisis.

La determinación de los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa en los extractos etanólicos se llevó a cabo mediante ensayos enzimáticos en los que se midió espectrofotométricamente la formación de NADPH a 339 nm. En cubetas de espectrofotómetro se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del extracto etanólico junto con 50  $\mu\text{l}$  de etanol al 50 % (v/v). Después se añadió una mezcla de ensayo que contenía: tampón imidazol-HCl 87,5 mM (pH 6,9),  $\text{MgCl}_2$  2,63 mM, NADP 0,43 mM y ATP 1,3 mM hasta completar un volumen final de 0,8 ml. Las cubetas se agitaron cuidadosamente para homogeneizar la mezcla de ensayo y se introdujeron en un espectrofotómetro JASCO V-530 termostatzado a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Se comenzó a medir a lo largo del tiempo la absorbancia de las muestras a 339 nm, y cuando la señal de absorbancia fue estable se añadieron 2,4 U de hexoquinasa junto con 1,2 U de glucosa-6-P deshidrogenasa para la determinación de glucosa. Seguidamente se añadieron 2,4 U de fosfoglucosa isomerasa para determinar la fructosa y, por último, 320 U de invertasa para la cuantificación de sacarosa. Entre cada una de las adiciones enzimáticas siempre se esperó a que la señal se estabilizara. Los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa de las muestras se determinaron a partir del NADPH formado, teniendo en cuenta que la estequiometría con el NADPH es de 1:1 para la glucosa y fructosa, y 2:1 para la sacarosa, y que el coeficiente de extinción del NADPH a 339 nm es  $6,22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

#### II.8.4. Determinación de almidón

La determinación de almidón se llevó a cabo a partir de los precipitados obtenidos en la extracción de carbohidratos solubles. A dichos precipitados se les añadieron respectivamente 1 ml de agua desionizada y se mantuvieron a una temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas. Transcurrido ese tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se tomó una parte alícuota de 50  $\mu\text{l}$  y se añadieron 950  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contenía acetato sódico 80 mM (pH 4,9), 1,4 U de amiloglucosidasa y 2 U de  $\alpha$ -amilasa. Para lograr la hidrólisis total del

almidón los viales se mantuvieron durante 12 horas a 37 °C; posteriormente se centrifugaron a 14.000 g durante 5 minutos y del sobrenadante se tomó una muestra de 100 µl en la cual se determinó el contenido de glucosa como se describe en el apartado anterior. La cantidad de almidón se expresó como µmol de glucosa equivalente (µmol heq) por gramo de peso fresco.

### II.8.5. Determinación de la concentración de pigmentos

Entre 20 y 25 mg de las muestras trituradas y almacenadas a –80 °C se homogeneizaron en 2 ml de acetona al 80 % (v/v). Este extracto se dejó reposar durante 1 hora a 4 °C en oscuridad y después se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante, frente a acetona al 80 % (v/v), a 470 nm, 646,8 nm y 663,2 nm en un espectrofotómetro ThermoSpectronic heλios α.

Las concentraciones de clorofila *a* ( $C_a$ ), clorofila *b* ( $C_b$ ) y carotenoides totales ( $C_{x+c}$ ) se calcularon mediante las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler 1987):

$$C_a = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$C_b = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b}{198}$$

Las concentraciones de pigmentos en estas ecuaciones vienen expresadas en µg ml<sup>-1</sup>.

### II.8.6. Determinación de fenoles

La concentración total de fenoles se determinó según se describe en Camacho-Cristóbal et al. (2002). Para ello se distribuyeron en viales entre 20 y 30 mg de cada una de las muestras trituradas y almacenadas a –80 °C y se homogeneizaron en 500 µl de metanol puro. Los extractos se incubaron en oscuridad durante 1 hora en hielo y tras este periodo se centrifugaron a 13.000 g durante 15 minutos a 4 °C. A continuación de cada vial se trasvasaron 200 µl del sobrenadante a un nuevo vial, se añadieron 1,1 ml de carbonato sódico al 2 % (p/v) y 200 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua desionizada; este último reactivo se preparaba justo antes de la determinación de fenoles. Los viales se

incubaron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 765 nm frente al blanco.

La cuantificación de los fenoles se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en una recta de calibrado realizada con el método anterior utilizando ácido cafeico como patrón.

## **II.9. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

Para la extracción de las enzimas glutatión reductasa (GR) y peroxidasa (POX) se tomaron 250 mg de peso fresco de cada muestra finamente triturada y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se homogeneizaron en una proporción 1:4 (p/v) con un tampón de extracción que contenía: fosfato sódico 50 mM (pH 7,8), polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 2 % (p/v) y EDTA 1 mM. A continuación las mezclas se centrifugaron a 13.000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se utilizó como extracto para el ensayo de las actividades GR y POX.

La actividad de la enzima glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) se determinó de acuerdo con el método de Foyer y Halliwell (1976), que se basa en la reducción del glutatión oxidado (GSSG) medida a 340 nm. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato sódico 25 mM (pH 7,8), GSSG 5 mM, NADPH 1,2 mM y 100  $\mu\text{l}$  del extracto. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1  $\mu\text{mol}$  GSSG oxidado  $\text{min}^{-1}$ . El coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm es  $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad de la enzima peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7) se determinó de acuerdo con el método de Herzog y Fahimi (1973). La mezcla de reacción contenía tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina 0,5 mM, gelatina al 0,1 % (p/v), tampón citrato-fosfato sódico 150 mM (pH 4,4),  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,6 % (v/v) y 50  $\mu\text{l}$  del extracto. El aumento en la absorbancia a 465 nm se registró durante 3 minutos y una unidad de actividad enzimática se definió como 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  descompuesto  $\text{ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Un incremento en la absorbancia a 465 nm de 3,16 unidades equivale 1 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  descompuesto.

Para la extracción de la enzima NADPH oxidasa se tomaron 100 mg de peso fresco de cada muestra finamente triturada y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se homogeneizaron en una proporción 1:5 (p/v) con un tampón de extracción que contenía: tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1 % (p/v), EDTA 0,1 mM y Tritón-X 100 al 0,1 % (v/v). A continuación las mezclas se centrifugaron a 13.000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se utilizó como extracto para el ensayo de la actividad NADPH oxidasa.



La actividad de la enzima NADPH oxidasa se determinó de acuerdo con el método de Sagi y Fluhr (2001), que se basa en la reducción del 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio-5-carboxanilida (sal sódica) (XTT, sal sódica) medida a 470 nm. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), XTT 0,5 mM, NADPH 1,2 mM y 100 µl del extracto. La reacción se inició mediante la adición del NADPH a la mezcla. La absorbancia de las muestras se midió frente a una muestra blanco que contenía ZnCl<sub>2</sub> 10 mM, el cual inhibe la actividad NADPH oxidasa. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µmol XTT reducido min<sup>-1</sup>. El coeficiente de extinción del XTT a 470 nm es de 2,16 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## **II.10. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ABCSÍSCO**

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia.

### **II.10.1. Extracción**

Para la extracción de esta hormona se utilizaron 200 mg de raíces finamente trituradas y almacenadas a -80 °C. El material se homogenizó con 10 volúmenes de una mezcla de metanol al 80 % (v/v) y ácido acético al 1 % (v/v). En esta etapa se añadió el patrón interno del ácido abscísico (hormona deuterada). Los viales se mantuvieron en agitación a 4 °C durante una hora para la extracción y posteriormente se centrifugaron a 14.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se trasvasó a un tubo de vidrio y, con la ayuda de un rotavapor, se eliminó el metanol para obtener un extracto acuoso, el cual se diluyó hasta 1 ml con ácido acético al 1 % (v/v).

### **II.10.2. Purificación y cuantificación**

Para la purificación del ácido abscísico se utilizaron columnas Oasis (Waters) con 1 ml de relleno (30 mg), optimizadas para 100-200 mg de material fresco. El proceso de purificación se llevó a cabo en tres etapas:

- En el primer paso de purificación se utilizó una columna Oasis HLB de fase reversa para eliminar restos de sales y compuestos muy polares. En la columna previamente equilibrada se aplicó el extracto acuoso; posteriormente se lavó la columna con 1 ml de ácido acético al 1 % (v/v) y se eluyó con 1 ml de ácido acético al 1 % (v/v) en metanol. De nuevo

se evaporó el metanol en un rotavapor y se diluyó el extracto acuoso hasta 1 ml con ácido acético al 1 % (v/v).

- A continuación, el extracto acuoso se pasó a través de una columna Oasis MCX de intercambio catiónico previamente equilibrada. Después de lavar la columna con 1 ml de ácido acético al 1 % (v/v) se eluyó con 1 ml de ácido acético al 1 % (v/v) en metanol. De nuevo se evaporó el metanol en el rotavapor y se diluyó el extracto acuoso hasta 1 ml con ácido acético al 1 % (v/v). Este extracto contiene el ácido abscísico, entre otras hormonas ácidas.

- Por último, se añadió el extracto acuoso a una columna Oasis Wax de intercambio aniónico previamente equilibrada. La columna se lavó con 1 ml de ácido acético al 1 % (v/v) y las hormonas ácidas se eluyeron con 1 ml de ácido acético al 1 % (v/v) en metanol y a continuación con 1 ml de metanol al 80 % (v/v); ambas fracciones se recolectaron en un mismo vial. Se dejó secar en el rotavapor y el residuo se disolvió en una mezcla de acetonitrilo al 5 % (v/v) y ácido acético al 1 % (v/v).

El ácido abscísico fue cuantificado mediante un UPLC acoplado a espectrometría de masas (Q-Exactive, Orbitrap, Thermo Fisher Scientific).

## **II.11. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PIP**

### **II.11.1. Aislamiento y cuantificación de proteínas microsomales**

Alrededor de 500 mg de raíz fueron finamente triturados en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron durante 3 minutos con dos volúmenes de 5 ml de tampón de extracción, cuya composición fue: HEPES-KOH 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM (pH 8,0), PMSF 1 mM, BHT 0,1 mg/ml, DTT 2 mM, PVPP al 0,1 % (p/v) y sacarosa 0,5 M.

El homogeneizado resultante se filtró a través de dos capas de Miracloth en tubos de centrífuga (SS-24). Después de la centrifugación a 8.000 g durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se filtró por una capa de Miracloth colocada sobre los tubos de ultracentrífuga (Sorvall RC 5B+), y las muestras se centrifugaron a 24.000 g durante 40 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y se añadieron al precipitado 150 µl de tampón de resuspensión, que contenía: fosfato potásico 5 mM (pH 7,8), KCl 4 mM, DTT 2 mM y sacarosa 0,33 M. La mezcla se incubó a 4 °C durante 30 minutos tras los cuales se homogeneizó utilizando un

Dounce (Wheaton, Millville, EE.UU.). Las fracciones microsomales obtenidas se trasvasaron a viales de 1,5 ml y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La cuantificación de la concentración de proteínas en la fracción microsomal se realizó según el método de Bradford (1976). La concentración de proteína se calculó interpolando las absorbancias de las muestras en una recta de calibrado realizada con BSA como patrón.

### II.11.2. ELISA para la determinación de las proteínas PIP1 y PIP2

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Helmholtz Zentrum, Institute of Biochemical Plant Pathology, en Múnich (Alemania).

El inmunoensayo se realizó en placas de 96 celdas Nunc Maxi-Sorp Immuno Plate. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de antígeno a cada pocillo (diluciones seriadas 0,02–5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de proteínas microsomales en tampón bicarbonato/carbonato 0,1 M, pH 9,5), se incubó la placa durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y, a continuación, se realizaron tres lavados con PBS (tampón fosfato salino). Tras el último lavado se secó muy bien la placa, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de BSA y se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después de la incubación se lavó tres veces con Tween 20 al 0,1 % (v/v) en PBS, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo primario (anti-PIP1 o anti-PIP2) diluido 1:10.000 y se dejó en incubación durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se lavó de nuevo la placa tres veces con Tween 20 al 0,1 % (v/v) en PBS, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo secundario diluido 1:10.000 y se dejó incubar durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo se realizaron 5 lavados con PBS, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del sustrato ABTS [2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] y después de 30 minutos la absorbancia se midió a 405 nm. Según los valores de absorbancia de las diferentes concentraciones de proteína se calculó la pendiente de la recta para cada muestra y se compararon entre ellas.

El anti-PIP1 reconoce la secuencia MEGKEEDVRVGANKFPERQ de 19 aminoácidos del extremo N- terminal de las proteínas PIP1. A continuación se muestran las zonas de las secuencias de las proteínas PIP1 donde se localiza el epítipo diana.

#### Proteínas PIP1

#### Epítipo diana

PIP1;1	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQSDKDYKEPPPAPFF
PIP1;2	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQSDKDYKEPPPAPLF
PIP1;3	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQTDKDYKEPPPAPFF

PIP1;4	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQSTDKDYKEPPP APL
PIP1;5	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQTEDDKDYKEPPP APF

El anti-PIP2 reconoce la secuencia CRASGSKSLGSFRSAANV de 18 aminoácidos del extremo C- terminal de las proteínas PIP2. A continuación se muestran las zonas de las secuencias de las proteínas PIP2 donde se localiza el epítipo diana.

<b>Proteínas PIP2</b>	<b>Epítipo diana</b>	
PIP2;1	AFYHQFV LRASGSKSLGS	FRSAANV
PIP2;2	AFYHQFV LRASGSKSLGS	FRSAANV
PIP2;3	AFYHQFV LRASGSKSLGS	FRSAANV

## **II.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En los experimentos llevados a cabo en plantas de arabidopsis los datos que se representan son la media y la desviación estándar de todos los análisis individuales. Todos los resultados se analizaron mediante el test de *t*-Student.

## **III. RESULTADOS**

Como ha quedado de manifiesto en la Introducción, la toxicidad de boro afecta de forma negativa al desarrollo de las plantas vasculares. Se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que causan esta toxicidad, así como de las respuestas de las plantas para hacer frente a este tipo de estrés.

En este trabajo se realizó una aproximación experimental para estudiar el efecto de la toxicidad de boro en la planta *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0). Se llevó a cabo un análisis integral empleando diferentes técnicas (biología molecular, bioquímicas, histoquímicas y ecofisiológicas) para poner de manifiesto algunos de los mecanismos utilizados por esta planta modelo para reducir los efectos negativos derivados de la toxicidad de boro.

### **III.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA RESPUESTA DE LAS RAÍCES DE ARABIDOPSIS A LA TOXICIDAD DE BORO**

Este análisis se realizó en las raíces ya que es el órgano vegetal que primero percibe los cambios en las concentraciones de nutrientes del suelo. Para ello las plantas fueron cultivadas en un sistema hidropónico y tratadas con exceso de boro (5 mM) durante 24 horas (ver Materiales y Métodos, II.1.1).

#### **III.1.1. Análisis de la expresión génica mediante microarrays**

Para conocer los cambios que produce la toxicidad boro a nivel de expresión génica en la raíz de *arabidopsis*, se hizo un análisis completo de la expresión de genes de esta planta mediante microarrays utilizando el GeneChip<sup>®</sup> ATH1 de Affymetrix.

En la Tabla 6 se representan genes cuya expresión aumentó más de dos veces en condiciones de toxicidad respecto al control y clasificados en distintas categorías funcionales utilizando el software MapMan 3.5.1 (Thimm et al., 2004).

Los análisis de microarrays revelaron que la toxicidad de boro produjo un aumento en los niveles de transcritos de genes que intervienen en la biosíntesis, señalización y respuesta a diferentes hormonas como son el ácido abscísico (ABA), el etileno y las citoquininas (Tabla 6).

Dentro del grupo de genes relacionados con el ABA, el dato más significativo fue el aumento de expresión en más de 14 veces que experimentó el gen *NCED3* –clave para la

biosíntesis de ABA– como respuesta al tratamiento con toxicidad de boro (Tabla 6). La expresión de los genes *ABI1* y *ABI2*, los cuales intervienen en la ruta de señalización de ABA, también aumentó significativamente en las raíces de plantas de arabidopsis tratadas con boro 5 mM durante 24 horas (Tabla 6).

Respecto a los genes que intervienen en la biosíntesis y señalización de etileno, se observó un aumento de 3,76 veces en los niveles de transcritos del gen *ACS11* (el cual codifica la enzima ACC sintasa). El gen *EIN2*, que interviene en la respuesta a etileno, aumentó sus niveles de transcritos en 2,17 veces tras 24 horas de tratamiento con toxicidad de boro (Tabla 6).

También se observó un incremento en la expresión de diferentes genes que intervienen en la señalización de citoquininas y en la respuesta a auxinas (Tabla 6).

Además, hubo un aumento de los niveles de transcritos de diversos genes que codifican ciclinas implicadas en la regulación del ciclo celular (Tabla 6).

Es interesante destacar el aumento de expresión observado en los genes *CASP4* y, sobre todo, *CASP5*, los cuales codifican proteínas que intervienen en la correcta formación de la banda de Caspary (Tabla 6).

Además, se produjo un incremento en la expresión de genes relacionados con la modificación de la pared celular (pectín liasa, lacasas, peroxidasas, etc.) en las raíces de las plantas tratadas con toxicidad de boro (Tabla 6).

**Tabla 6.** Genes sobreexpresados en las raíces de plantas de arabisidopsis tras 24 horas de tratamiento con boro 5 mM. Las plantas fueron tratadas con boro 10  $\mu$ M en las condiciones control (C) o con boro 5 mM en las de toxicidad de boro (++B). Los niveles de expresión diferencial se expresan como el cociente entre la señal de las muestras de toxicidad en boro y la señal de las muestras control. Solo se muestran aquellos genes para los que se obtuvo un valor absoluto de expresión diferencial  $\geq 2$  y un  $p$ -valor  $< 0,01$ . (n.a., nombre no asignado).

Gen	Nombre	Descripción	Cambio de expresión ++B/C
<b>BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y RESPUESTA DE HORMONAS</b>			
<i>Ácido abscísico</i>			
At3g14440	<i>NCED3</i>	9-cis-epoxicaroteoide dioxigenasa	14,3
At5g57050	<i>ABI2</i>	Fosfatasa del tipo PP2C	3,57
At5g50600	<i>HSD1</i>	Hidroesteroide deshidrogenasa	2,48
At4g26080	<i>ABI1</i>	Fosfatasa del tipo PP2C	2,35
<i>Etileno</i>			
At4g08040	<i>ACS11</i>	ACC sintasa	3,76
At2g40940	<i>ERS1</i>	Factor de respuesta a etileno	2,27
At1g01060	<i>LHY</i>	Factor de transcripción	2,24
At5g03280	<i>EIN2</i>	Receptor de etileno	2,17
<i>Citoquininas</i>			
At2g40670	<i>ARR16</i>	Regulador de respuesta a citoquininas	3,65
At3g56380	<i>ARR17</i>	Regulador de respuesta a citoquininas	3,30
At4g16110	<i>ARR2</i>	Regulador de respuesta a citoquininas	2,27
At1g71930	<i>ANAC030</i>	Factor de transcripción	2,26
At2g01830	<i>AHK4</i>	Receptor de citoquininas	2,09
<i>Auxinas</i>			
At3g24280	<i>SMAP2</i>	Elemento de respuesta a auxinas	5,75
At1g48690	<i>GH3</i>	Elemento de respuesta a auxinas	4,17
At4g00880	<i>SAUR</i>	Elemento de respuesta a auxinas	3,44
At1g27740	<i>RSL4</i>	Factor de transcripción	2,59
At3g59900	<i>ARGOS</i>	Elemento de respuesta a auxinas	2,15
<b>CICLO CELULAR</b>			
At5g61650	<i>CYCP4;2</i>	Ciclina reguladora del ciclo celular	3,92
At5g07450	<i>CYCP4;3</i>	Ciclina reguladora del ciclo celular	2,76
At1g70210	<i>CYCD1;1</i>	Ciclina reguladora del ciclo celular	2,60



**BANDA DE CASPARY**

At5g15290	<i>CASP5</i>	Proteína de la banda de Caspary	14,98
At5g06200	<i>CASP4</i>	Proteína de la banda de Caspary	2,11

**PARED CELULAR**

At1g05310	n.a.	Pectín liasa	4,95
At1g23760	<i>PG3</i>	Poligalacturonasa	4,08
At5g22410	<i>RHS18</i>	Peroxidasa	3,16
At5g64120	<i>PRX71</i>	Peroxidasa	2,94
At2g29130	<i>LAC2</i>	Lacasa	2,91
At1g49570	n.a.	Peroxidasa	2,90
At1g09890	n.a.	Ramnogalacturonato liasa	2,90
At3g15370	<i>EXPA12</i>	Expansina	2,89
At5g51890	n.a.	Peroxidasa	2,78
At5g60020	<i>LAC17</i>	Lacasa	2,61
At5g03260	<i>LAC11</i>	Lacasa	2,25

En la Tabla 7 se recogen aquellos genes cuya expresión se redujo más de dos veces tras 24 horas de toxicidad de boro. Entre estos, es interesante destacar la disminución en los niveles de transcritos que se observó en el grupo de genes que codifican determinadas enzimas de la biosíntesis de glucosinolatos (Tabla 7). Así, por ejemplo, el gen *MAM1* redujo sus niveles de transcritos hasta 20 veces en las raíces de las plantas tratadas con boro 5 mM durante 24 horas (Tabla 7). Además, se produjo una disminución de la expresión de genes involucrados en el transporte de diversos metabolitos. Como era de esperar, los niveles de transcritos del transportador de boro NIP5;1 disminuyeron alrededor de tres veces en las plantas tratadas con toxicidad de boro (Tabla 7). También se observó un descenso de los niveles de transcritos de los genes *SUC6* y *NRT1.5*, los cuales codifican transportadores de sacarosa y de nitrato, respectivamente.

**Tabla 7.** Genes cuya expresión se redujo en las raíces de plantas de arabisopsis tras 24 horas de tratamiento con boro 5 mM. Las plantas fueron tratadas con boro 10  $\mu$ M en las condiciones control (C) o con boro 5 mM en las de toxicidad de boro (++B). Los niveles de expresión diferencial se expresan como el inverso del cociente entre la señal de las muestras de toxicidad en boro y la señal de las muestras control, y con el signo cambiado. Solo se muestran aquellos genes para los que se obtuvo un valor absoluto de expresión diferencial  $\geq 2$  y un  $p$ -valor  $< 0,01$ .

Gen	Nombre	Descripción	Cambio de expresión ++B/C
<b>GLUCOSINOLATOS</b>			
At5g23010	<i>MAM1</i>	Metiltioalquilmalato deshidrogenasa	-20,69
At3g19710	<i>BCAT4</i>	Amino transferasa	-13,21
At1g65860	<i>FMO GS-OX1</i>	Glucosinolato-S-oxigenasa	-5,76
At5g23020	<i>IMS2</i>	Metiltioalquilmalato sintasa	-4,29
At1g62560	<i>FMO GS-OX3</i>	Glucosinolato-S-oxigenasa	-3,41
<b>TRANSPORTE</b>			
At1g32450	<i>NRT1.5</i>	Transportador de nitrato	-3,78
At5g43610	<i>SUC6</i>	Transportador de sacarosa	-3,02
At4g10380	<i>NIP5;1</i>	Transportador de ácido bórico	-2,83
At4g25960	<i>ABCB2</i>	Transportador ABC	-2,47
At1g79360	<i>OCT2</i>	Transportador de carbohidratos	-2,27

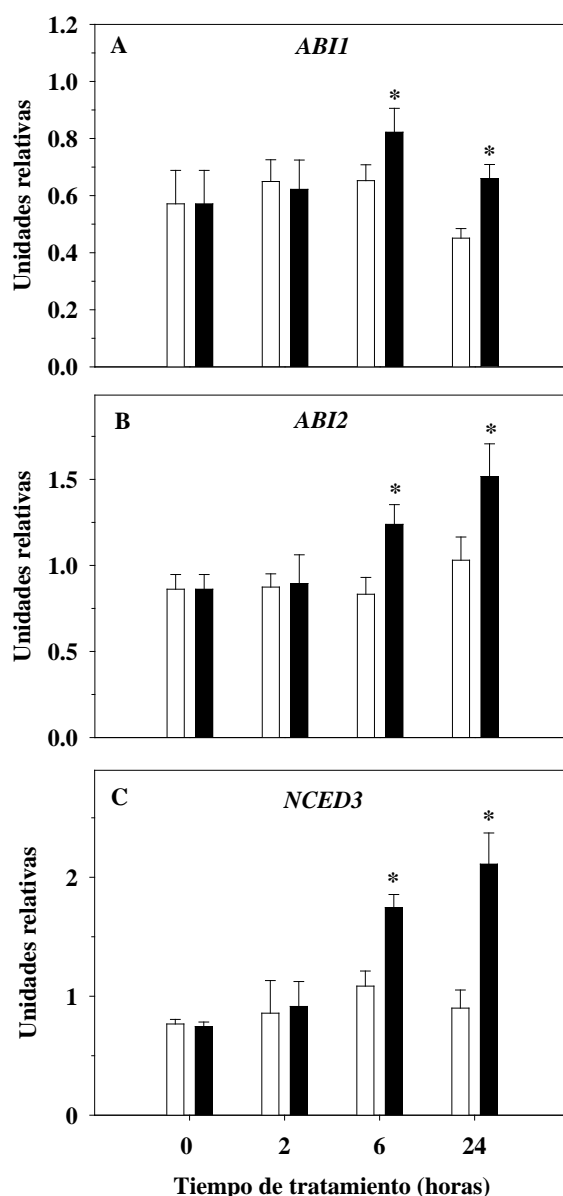
### III.1.2. Análisis de la expresión génica mediante Q-RT-PCR a tiempo real

Para comprobar la fidelidad de los datos obtenidos en los análisis de microarrays se realizó un estudio de la expresión diferencial de algunos de los genes afectados por la toxicidad de boro empleando la técnica de Q-RT-PCR a tiempo real.

#### III.1.2.1. Análisis de la expresión de genes relacionados con ABA y etileno

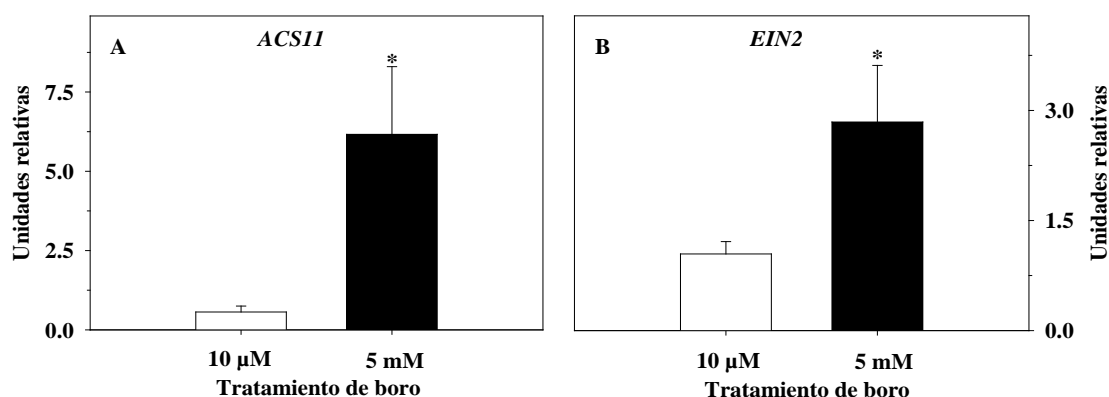
La expresión de diversos genes involucrados en la biosíntesis y señalización de ABA fue analizada mediante Q-RT-PCR en las raíces de plantas de arabisopsis (Figura 8). La expresión de los genes analizados no varió mucho durante las 24 horas de tratamiento en las plantas cultivadas en condiciones control, mientras que en las plantas tratadas con toxicidad

de boro se produjo un aumento en los niveles de transcritos de los genes analizados al final del experimento. Por tanto, la expresión de los genes *ABI1* y *ABI2* y, sobre todo, *NCED3* se vio incrementada tras 6 y 24 horas de tratamiento de toxicidad en comparación con el control (Figura 8). Estos resultados confirman los obtenidos en el experimento de microarrays (Tabla 6).



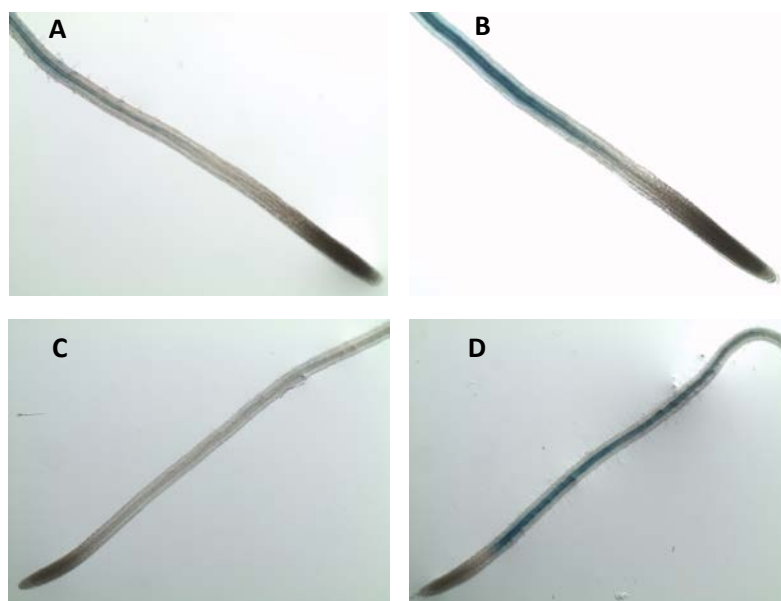
**Figura 8.** Análisis por Q-RT-PCR a tiempo real de los niveles de transcritos de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de ABA en las raíces de arábidopsis. Se representa la expresión relativa de los genes *ABI1* (A), *ABI2* (B) y *NCED3* (C) en las raíces de plantas tratadas con boro 10 μM (□) o 5 mM (■) durante 24 horas. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis de la expresión se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada tratamiento y tiempo analizados. Con asterisco se indican diferencias estadísticamente significativas entre los respectivos tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor < 0,01).

Por lo que se refiere a los genes relacionados con el etileno, el gen *ACS11* aumentó su expresión más de 6 veces en las raíces de plantas tratadas con boro 5 mM (Figura 9A). Además, es interesante destacar el aumento de expresión que experimentó el gen *EIN2* – implicado en la señalización de etileno– en las raíces de *arabidopsis* tras 24 horas de tratamiento con boro 5 mM (Figura 9B).



**Figura 9.** Análisis por Q-RT-PCR a tiempo real de los niveles de transcritos de genes relacionados con el etileno en las raíces de *arabidopsis*. Se representa la expresión relativa de los genes *ACS11* (A) y *EIN2* (B) en las raíces de plantas tratadas con boro 10  $\mu$ M ( $\square$ ) o 5 mM ( $\blacksquare$ ) tras 24 horas de tratamientos. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis de la expresión se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada tratamiento. Con asterisco se indican diferencias estadísticamente significativas entre los respectivos tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).

Para confirmar el resultado obtenido con el gen *ACS11* se llevó a cabo un análisis histoquímico utilizando la línea reportera *ACS11::GUS*. Semillas de esta línea se cultivaron *in vitro* durante 6 días con boro 10  $\mu$ M y, posteriormente, las plántulas se traspasaron a medio control (boro 10  $\mu$ M) y a medio con toxicidad de boro (5 mM). Tras 8 o 24 horas de tratamiento se reveló la actividad GUS en las raíces de *arabidopsis* (Figura 10). En las plantas control, el patrón de tinción se localizó alrededor de los haces vasculares en la zona de elongación/maduración de la raíz (Figura 10A,C). Las plantas sometidas a toxicidad de boro mostraron una mayor tinción alrededor de los haces vasculares a lo largo de la zona de elongación y maduración de la raíz (Figura 10B,D).

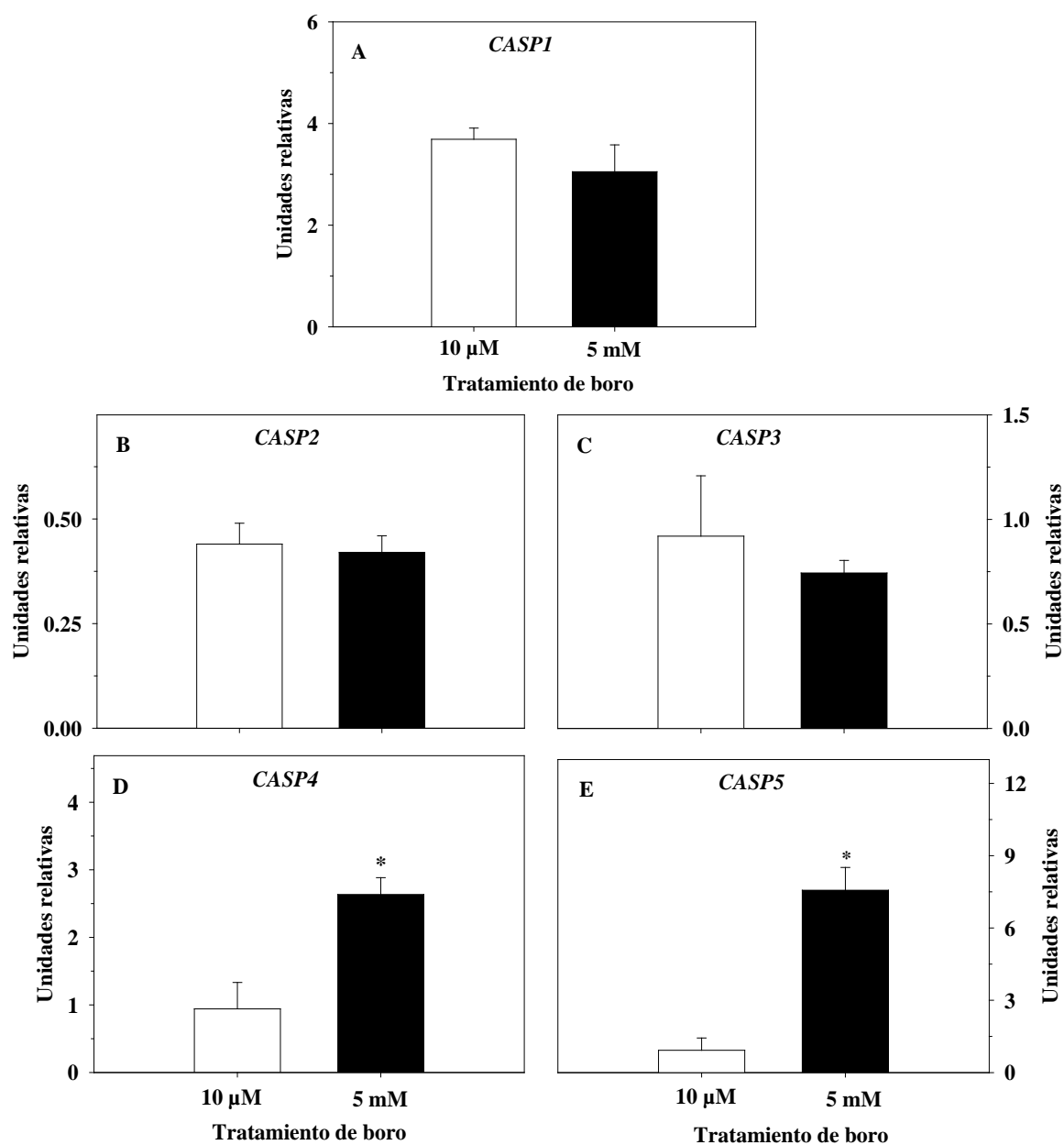


**Figura 10.** Efecto de la toxicidad de boro sobre la expresión de la línea reportera ACS11::GUS de arabidopsis. La actividad GUS fue analizada en las raíces de plantas transferidas a medio control (boro 10  $\mu$ M; **A**, **C**) o a medio con toxicidad de boro (5 mM; **B**, **D**) durante 8 (**A**, **B**) y 24 horas (**C**, **D**). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con al menos 10 plántulas por cada experimento.

#### III.1.2.2. Análisis de la expresión génica mediante Q-RT-PCR a tiempo real de genes que intervienen en la formación de la banda de Caspary

En la Figura 11 se representa el análisis de expresión de una familia de genes recientemente identificados denominados *CASP*, los cuales codifican proteínas localizadas en la banda de Caspary. Estas proteínas han sido clasificadas como esenciales para la correcta formación de esta banda (Roppolo et al., 2011).

Es interesante destacar el aumento significativo de 2,6 y 7,5 veces en los niveles de transcritos de los genes *CASP4* (Figura 11D) y *CASP5* (Figura 11E), respectivamente, tras 24 horas de tratamiento con boro 5 mM. Sin embargo, el resto de genes analizados que codifican las demás proteínas *CASP* (*CASP1*, *CASP2* y *CASP3*) no modificaron sus niveles de expresión en las raíces de plantas de *Arabidopsis* tratadas con boro 5 mM (Figura 11A-C).

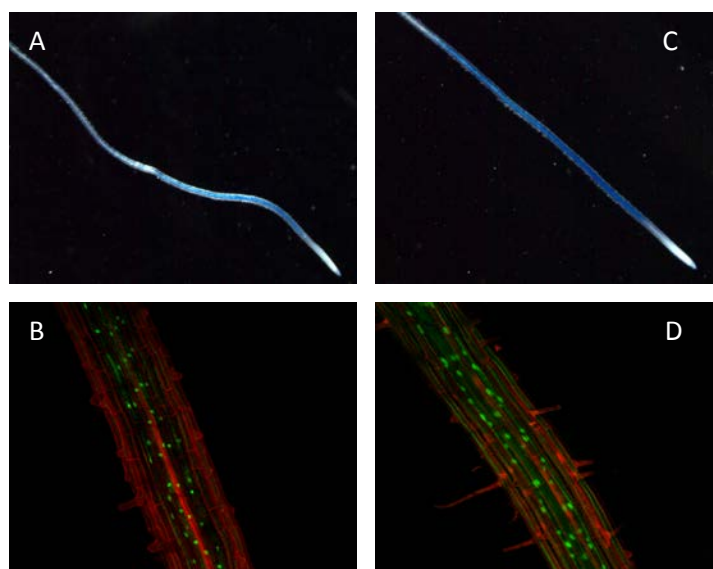


**Figura 11.** Análisis por Q-RT-PCR a tiempo real de los niveles de transcritos de genes relacionados con la banda de Caspary en las raíces de arábidopsis. Se representa la expresión relativa de los genes *CASP1* (A), *CASP2* (B), *CASP3* (C), *CASP4* (D) y *CASP5* (E) en las raíces de plantas tratadas con boro 10  $\mu$ M (□) o 5 mM (■) tras 24 horas de tratamientos. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis de la expresión se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada tratamiento. Con asterisco se indican diferencias estadísticamente significativas entre los respectivos tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor < 0,01).

Para confirmar el resultado del aumento de expresión del gen *CASP4* se cultivó *in vitro* la línea transgénica *CASP4::GUS::GFP*. Plántulas de 6 días fueron transferidas a medio de cultivo con concentraciones adecuadas de boro ( $10\ \mu\text{M}$ ) y otras a medio con toxicidad de boro ( $5\ \text{mM}$ ). Tras 24 horas del inicio del tratamiento se realizó un análisis histoquímico de las raíces (Figura 12A,C).

En las plantas control el patrón de expresión de *CASP4::GUS::GFP* se observó principalmente en la zona de transición entre las de elongación y maduración (Figura 12A). En las plantas sometidas a toxicidad de boro, se observó un incremento de la tinción que, además, se extendió a lo largo del inicio de la zona de maduración (Figura 12C).

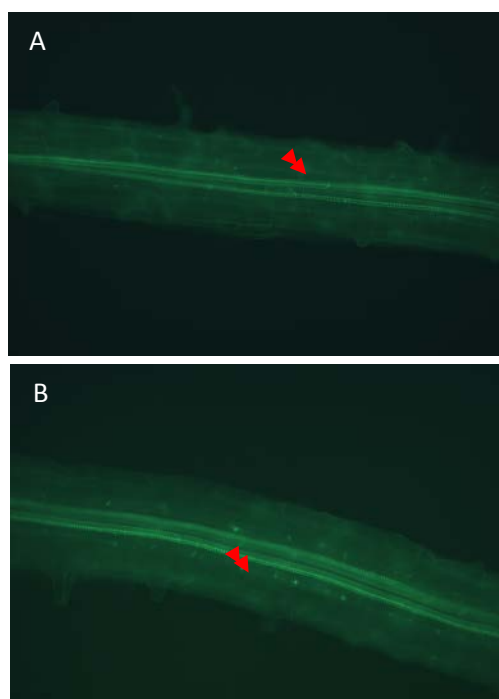
Los resultados de las tinciones fueron confirmados con imágenes tomadas mediante microscopía confocal para poder detectar la proteína GFP expresada bajo el promotor *CASP4* (Figura 12B,D). Las raíces se incubaron con yoduro de propidio para aumentar el contraste. La fluorescencia emitida por la proteína GFP fusionada al promotor del gen *CASP4* se localizó en la endodermis alrededor del cilindro central. En las plantas tratadas con boro  $5\ \text{mM}$  durante 24 horas se observó un aumento de la fluorescencia de la proteína GFP localizada en la banda de Caspary, de nuevo en la zona de transición elongación/maduración (Figura 12D).



**Figura 12.** Efecto de la toxicidad de boro en la expresión de *CASP4::GUS::GFP*. Se muestra la expresión de *CASP4::GUS::GFP* en las plantas de *arabidopsis* cultivadas en condiciones control (boro  $10\ \mu\text{M}$ ; **A**, actividad GUS; **B**, análisis GFP) o de toxicidad de boro ( $5\ \text{mM}$ ; **C**, actividad GUS; **D**, análisis GFP) durante 24 horas. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con al menos 10 plántulas por cada experimento.

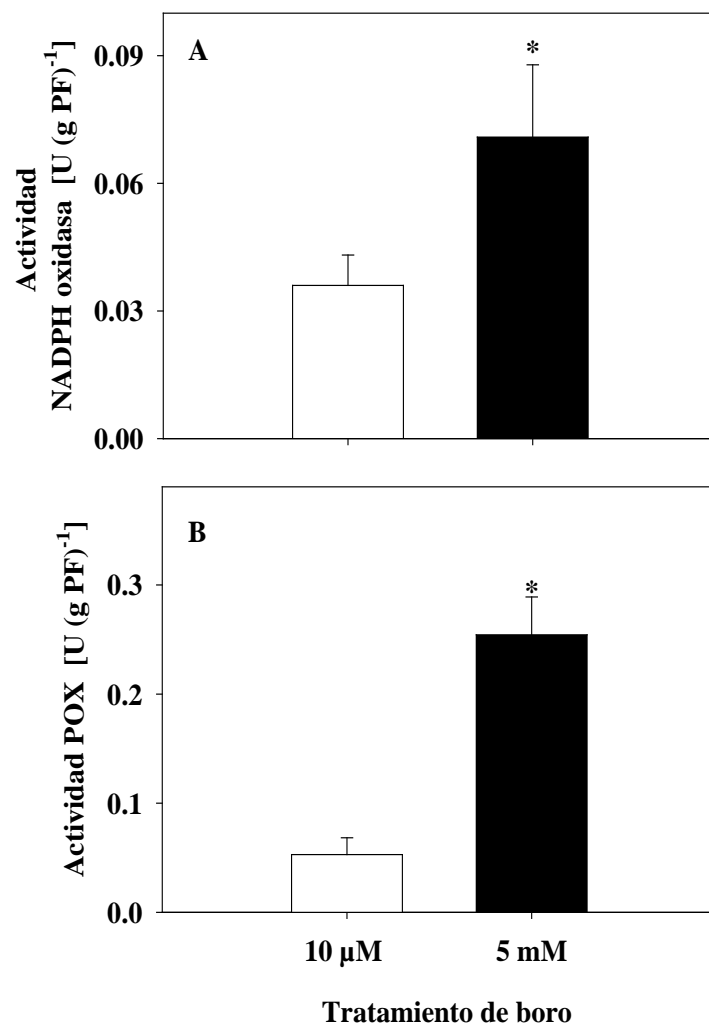


Para explorar aún más el efecto de la toxicidad de boro en la banda de Caspary, se realizó un estudio de la autofluorescencia emitida por esta estructura. Para ello, se cultivaron *in vitro* plantas de arabidopsis durante 6 días con boro 10  $\mu\text{M}$  y, posteriormente, se transfirieron a medio control (boro 10  $\mu\text{M}$ ) o con toxicidad de boro (5 mM) durante 24 horas. Tras este tratamiento, se procedió a realizar una clarificación de las raíces para observar la autofluorescencia emitida por los compuestos de naturaleza polifenólica que componen la banda de Caspary (Figura 13). La autofluorescencia de esta banda se observó en forma de puntos presentes en la cara interna de la endodermis (Figura 13). En las plantas tratadas con toxicidad de boro durante 24 horas la autofluorescencia de la banda de Caspary fue mayor que la presente en las plantas control (Figura 13).



**Figura 13.** Efecto de la toxicidad de boro en la autofluorescencia de la banda de Caspary tras la clarificación de las raíces de arabidopsis. Se muestra la autofluorescencia de la banda de Caspary (flechas) de las plantas cultivadas en condiciones control (boro 10  $\mu\text{M}$ ; **A**) o de toxicidad de boro (5 mM; **B**) durante 24 horas. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con al menos 10 plántulas por cada experimento.

Las actividades enzimáticas NADPH oxidasa y peroxidasa (POX) son importantes en los procesos de lignificación de la pared celular y, por tanto, en la formación de la banda de Caspary. En la Figura 14 se representan las actividades de estas enzimas en las raíces de plantas de arabidopsis tratadas o no durante 24 horas con toxicidad de boro. Ambas actividades enzimáticas fueron significativamente superiores en las raíces de las plantas tratadas con boro 5 mM en comparación con las del tratamiento control (Figura 14).



**Figura 14.** Efectos de la toxicidad de boro sobre las actividades de las enzimas NADPH oxidasa (A) y peroxidasa (POX) (B) en las raíces de arabidopsis. Se determinaron las actividades enzimáticas en condiciones control (boro 10 μM, □) o de toxicidad de boro (5 mM, ■) tras 24 horas de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada tratamiento. Con asterisco se indican diferencias estadísticamente significativas entre los respectivos tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

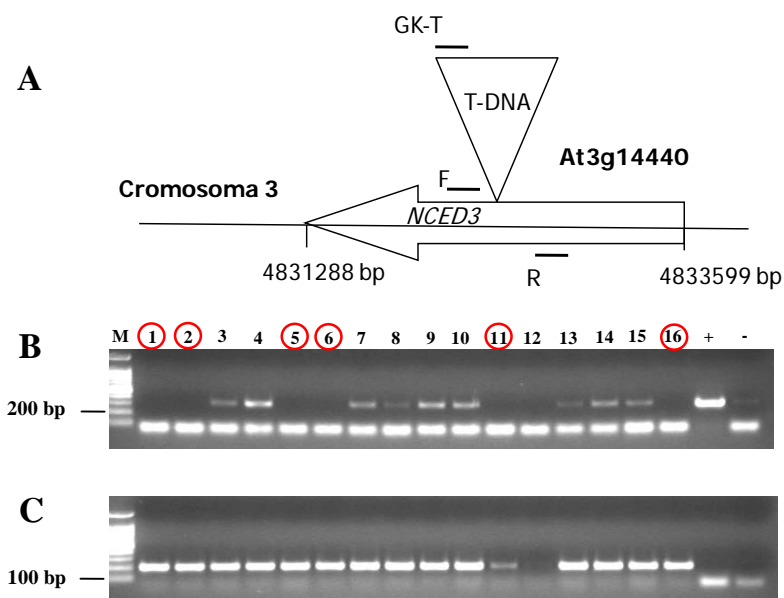
### III.2. ESTUDIO DE LOS GENOTIPOS SILVESTRE Y MUTANTE *nced3* BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR TOXICIDAD DE BORO

Uno de los resultados más interesantes obtenidos en el análisis transcriptómico fue la clara sobreexpresión que experimentó el gen *NCED3* en condiciones de toxicidad de boro. Este gen codifica una enzima clave para la biosíntesis de ABA, la cual es una hormona implicada en la respuesta de las plantas a los estreses abióticos.

Los estudios de genética inversa y el uso de mutantes con pérdida de función proporcionan un enfoque fiable para explorar la función integrada de un gen. En este estudio se utilizó el mutante *nced3*, el cual posee una inserción de T-DNA que interrumpe la expresión del gen *NCED3*, para investigar la función de este gen en la respuesta a la toxicidad de boro.

#### III.2.1. Caracterización de mutantes *nced3* homocigóticos

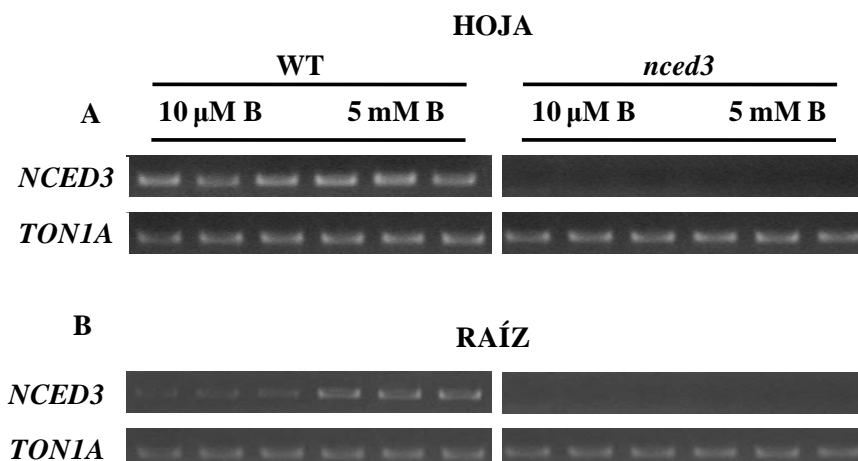
Los mutantes insercionales *nced3* fueron caracterizados a partir de semillas proporcionadas por el NASC mediante el genotipado de las plantas por PCR (ver Materiales y Métodos, II.3.1.1). Se seleccionaron aquellos mutantes en los que se verificó la presencia del T-DNA en los dos alelos del gen *NCED3* (Figura 15).



**Figura 15.** Selección de mutantes homocigóticos para el gen *NCED3*. **A**, esquema del gen *NCED3* y localización de la inserción del T-DNA. **B**, productos de la amplificación por PCR del DNA genómico de las plantas analizadas con los cebadores F y R. **C**, productos de la amplificación por PCR del DNA genómico de las plantas analizadas con los cebadores R y GK-T. Los círculos rojos indican las plantas homocigóticas para la mutación.

### III.2.1.1. Análisis de la expresión del gen *NCED3* en el mutante insercional *nced3*

Para confirmar la ausencia de transcritos del gen *NCED3* en los mutantes homocigóticos seleccionados se realizaron PCR semicuantitativas (Figura 16).



**Figura 16.** Análisis de los niveles de transcritos del gen *NCED3* mediante PCR semicuantitativa en las hojas (**A**) y en las raíces (**B**) de plantas de arabidopsis de los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* cultivadas en condiciones control (boro 10  $\mu$ M) o de toxicidad de boro (5 mM) durante 96 horas.

El mutante *nced3* se caracterizó por la ausencia de transcritos del gen *NCED3* tanto en las hojas como en las raíces (Figura 16). En el genotipo silvestre se produjo amplificación del gen *NCED3* (Figura 16). Es interesante destacar que la toxicidad de boro aumentó los niveles de transcritos del gen *NCED3* solo en las raíces (Figura 16B), mientras que los niveles de expresión en las hojas no mostraron cambios tras 96 horas de tratamiento con toxicidad de boro (Figura 16A).

### III.2.2. Efecto de la toxicidad de boro sobre el fenotipo del mutante *nced3*

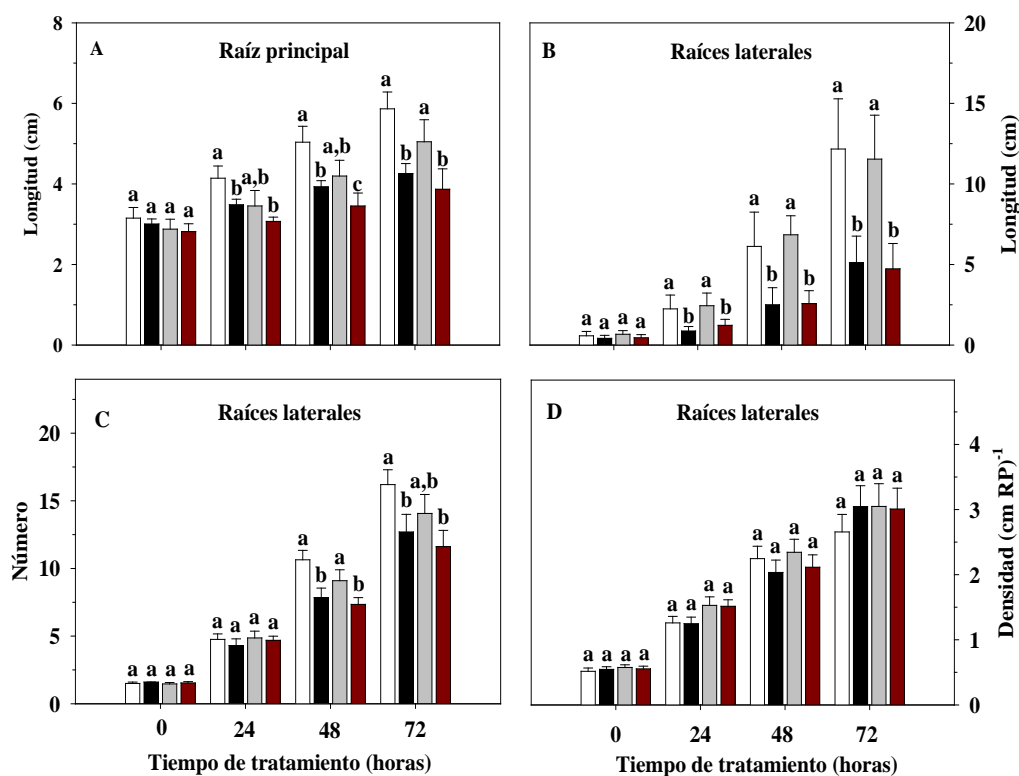
#### III.2.2.1. Análisis de la arquitectura radical

La arquitectura radical se analizó en plantas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* cultivadas *in vitro* con boro 10  $\mu$ M durante 6 días, y transferidas a medio control (boro 10  $\mu$ M) y a medio con toxicidad de boro (5 mM) donde permanecieron 72 horas (Figura 17).

El tamaño de la raíz principal en condiciones control al final del experimento fue de  $5,87 \pm 0,42$  cm en el genotipo silvestre y de  $5,05 \pm 0,55$  cm en el mutante *nced3*, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 17A). En las plantas tratadas con toxicidad de boro, el tamaño de la raíz principal se redujo significativamente en el genotipo silvestre a partir de 24 horas del inicio del tratamiento y tras 48 horas en el mutante *nced3* (Figura 17A). Al final del experimento el tamaño de la raíz principal en las plantas tratadas con toxicidad de boro fue de  $4,25 \pm 0,25$  cm en el genotipo silvestre y de  $3,87 \pm 0,51$  cm en el mutante *nced3* (Figura 17A).

Al final del tratamiento control la longitud total del sistema de raíces laterales fue de  $12,17 \pm 3,11$  cm en las plantas del genotipo silvestre y de  $11,54 \text{ cm} \pm 2,73$  cm en las plantas del mutante *nced3* (Figura 17B). En condiciones de toxicidad de boro se produjo una disminución significativa del tamaño del sistema de raíces laterales en ambos genotipos (Figura 17B).

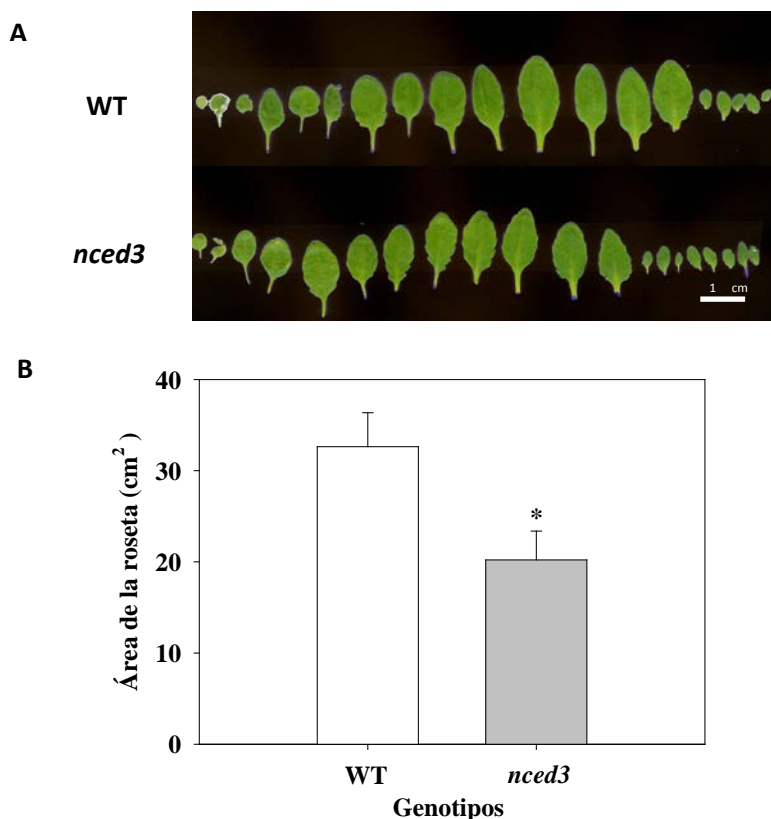
El número de raíces laterales en las condiciones control no mostró diferencias significativas entre ambos genotipos (Figura 17C). En cambio, en condiciones de toxicidad de boro se registró una disminución del número de raíces laterales en los genotipos tras 48 horas de tratamiento con boro 5 mM (Figura 17C). En cuanto a la densidad de raíces laterales no se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos y tratamientos (Figura 17D).



**Figura 17.** Efecto de la toxicidad de boro sobre diferentes parámetros de la arquitectura radical en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*. La longitud de la raíz principal (A) y de las raíces laterales (B), así como el número (C) y la densidad de raíces laterales (D) se determinó en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre  $\square$ ; mutante  $\blacksquare$ ) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre  $\blacksquare$ ; mutante  $\blacksquare$ ) durante 72 horas. Estos resultados son la media  $\pm$  SD de los análisis de al menos 20 plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

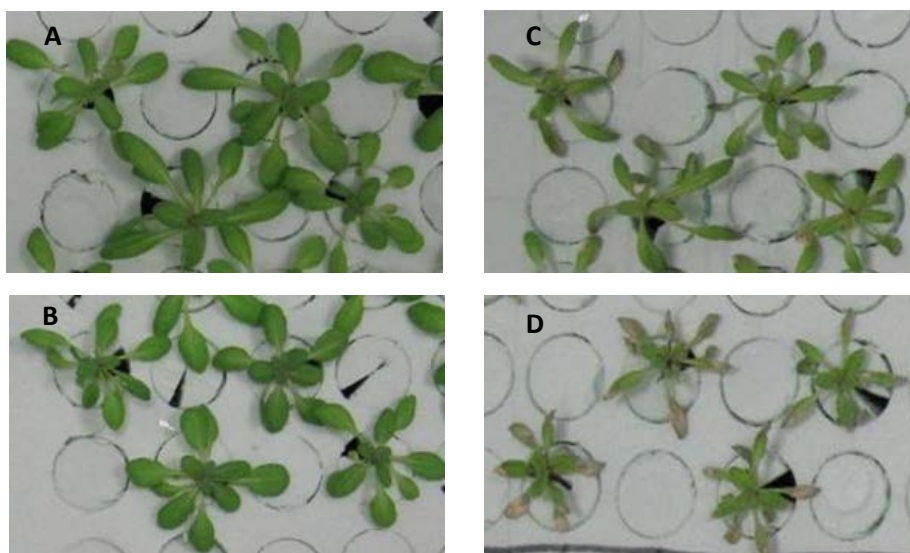
### III.2.2.2. Morfología foliar y área de la roseta

En la Figura 18A se muestra la morfología foliar de los genotipos silvestre y mutante *nced3* cultivados en hidroponía durante 35 días en condiciones control. Es de destacar que las hojas del mutante presentaron los márgenes más dentados que los de las hojas del genotipo silvestre (Figura 18A). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en el número de hojas presentes en la roseta entre ambos genotipos. El área media de la roseta del mutante fue significativamente menor que la del genotipo silvestre. Así, este presentó un área media de  $32,63 \pm 3,72 \text{ cm}^2$  mientras que la del mutante *nced3* fue de  $20,22 \pm 3,16 \text{ cm}^2$  (Figura 18B).



**Figura 18.** Morfología (A) y área media de la roseta (B) de plantas de arabidopsis de los genotipos silvestre WT (□) y mutante *nced3* (■) cultivadas en hidroponía en condiciones control (boro 10  $\mu\text{M}$ ) durante 35 días. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco plantas diferentes para cada genotipo. Con asterisco se indican diferencias estadísticamente significativas según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

A continuación se procedió a estudiar la aparición de los primeros síntomas visibles causados por la toxicidad de boro en las hojas. Para ello, las plantas de *arabidopsis* del genotipo silvestre y del mutante *nced3* cultivadas en hidroponía en un medio control (boro 10  $\mu$ M) durante cuatro semanas fueron sometidas o no a condiciones de toxicidad de boro (5 mM) durante 72 horas. Las plantas tratadas con boro 10  $\mu$ M no mostraron síntomas visibles de estrés, tales como necrosis, clorosis, epinastia o enrollamiento foliar (Figura 19A,B). En cambio, las plantas tratadas con toxicidad de boro mostraron manchas necróticas en los márgenes distales de las hojas (Figura 19C,D). No obstante, el mutante *nced3* resultó ser más sensible a este tipo de estrés abiótico, lo cual se reflejó en una mayor área de tejido necrótico en las hojas maduras en comparación con el genotipo silvestre (Figura 19C,D).



**Figura 19.** Efecto de la toxicidad de boro sobre la aparición de manchas necróticas en las hojas de plantas de *arabidopsis* del genotipo silvestre (A, B) y del mutante *nced3* (C, D) tratadas con boro 10  $\mu$ M (A, C) o con boro 5 mM (B, D) durante 72 horas. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con al menos 10 plántulas por cada experimento.



### III.2.3. Efecto de la toxicidad de boro sobre algunos parámetros ecofisiológicos

#### III.2.3.1. Tasa fotosintética e intercambio de gases

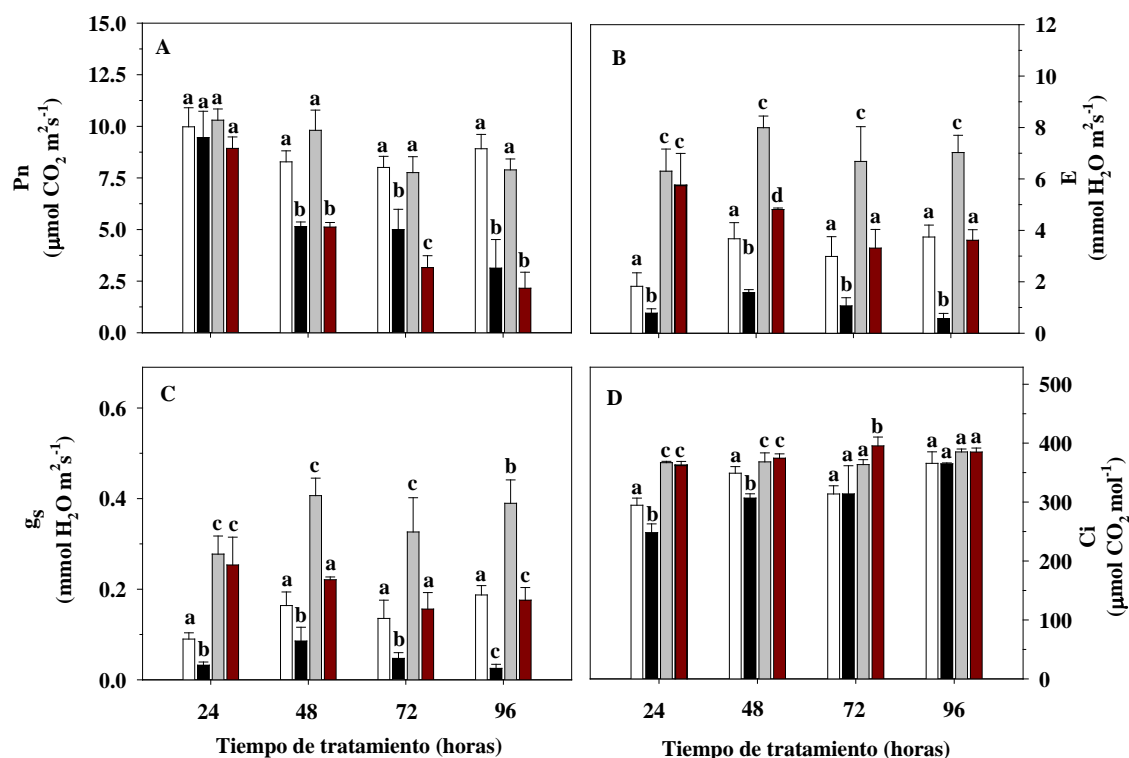
En la Figura 20 se representa la evolución de la tasa fotosintética ( $P_n$ ), tasa de transpiración ( $E$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ) y concentración interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) en las plantas de *arabidopsis* del genotipo silvestre y del mutante *nced3* a lo largo de 96 horas de tratamiento control y con toxicidad de boro.

La tasa de fotosíntesis neta en los genotipos silvestre y mutante *nced3* permaneció constante y con valores similares durante el tratamiento control (Figura 20A). En las plantas tratadas con boro 5 mM, la tasa de fotosíntesis neta disminuyó considerablemente en ambos genotipos desde las 48 horas del inicio del tratamiento (Figura 20A).

Independientemente del tratamiento de boro, el mutante *nced3* mostró una mayor tasa de transpiración que el genotipo silvestre a lo largo del experimento (Figura 20B). La toxicidad de boro causó una clara disminución de la tasa de transpiración con respecto a las condiciones control desde las 48 horas de tratamiento en ambos genotipos (Figura 20B).

Como se observa en la Figura 20C, la conductancia estomática mostró una tendencia similar a la transpiración, con claras diferencias entre ambos genotipos y tratamientos.

Con independencia del genotipo y tratamiento de boro, los valores de la concentración interna de  $CO_2$  fueron similares durante el experimento, excepto al inicio donde el mutante *nced3* tuvo unos valores más elevados que los de las plantas silvestres (Figura 20D).



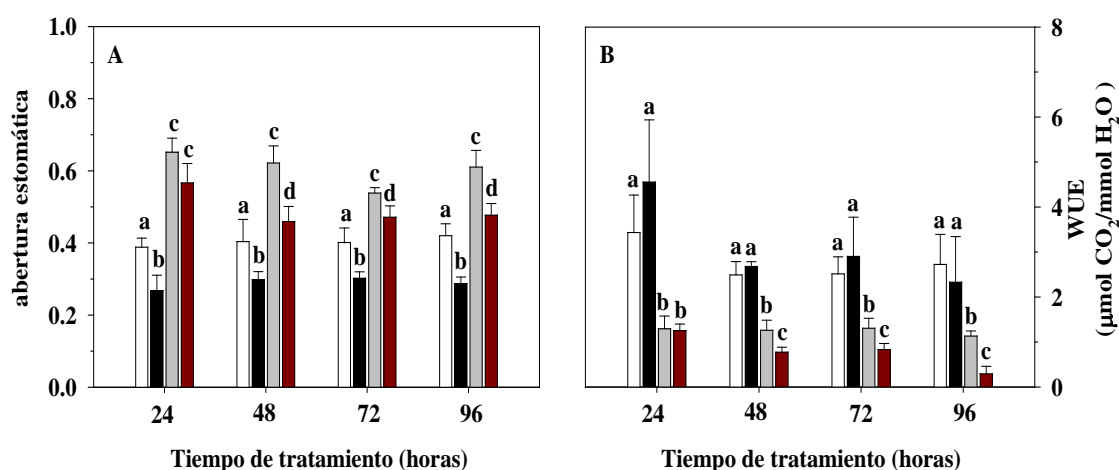
**Figura 20.** Efectos de la toxicidad de boro sobre diferentes parámetros ecofisiológicos en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*. Se determinaron los parámetros de la tasa de fotosíntesis neta (Pn) (A), tasa de transpiración (E) (B), conductancia estomática ( $g_s$ ) (C) y concentración interna de  $CO_2$  (Ci) (D) en condiciones control (boro 10  $\mu M$ ; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) durante 96 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).

### III.2.3.2. Abertura estomática y eficiencia en el uso del agua

En la Figura 21 se representan la abertura estomática y la eficiencia en el uso del agua (WUE) en plantas de *arabidopsis* del genotipo silvestre y del mutante *nced3* tratadas con boro 10  $\mu$ M o con 5 mM durante 96 horas.

Independientemente del tratamiento de boro la abertura estomática fue mayor en el mutante *nced3* en comparación con el genotipo silvestre. No obstante, el tratamiento de toxicidad de boro redujo la abertura estomática de ambos genotipos (Figura 21A).

La WUE –cociente entre la tasa fotosintética ( $P_n$ ) y la tasa de transpiración ( $E$ )– representa la eficiencia con la cual las plantas fijan  $\text{CO}_2$  en relación con la pérdida de agua por transpiración. La WUE del genotipo silvestre fue superior a la del mutante *nced3* durante todo el experimento (Figura 21B). La toxicidad de boro afectó solo de forma significativa a la WUE del mutante *nced3* desde las 48 horas de tratamiento (Figura 21B).



**Figura 21.** Efectos de la toxicidad de boro sobre la abertura estomática y la eficiencia en el uso del agua (WUE) en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*. Se determinaron los parámetros de abertura estomática (A) y eficiencia en el uso del agua (WUE) (B) en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre  $\square$ ; mutante  $\blacksquare$ ) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre  $\blacksquare$ ; mutante  $\blacksquare$ ) durante 96 horas. La abertura estomática se expresó como el ancho del poro dividido por la longitud de este. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).

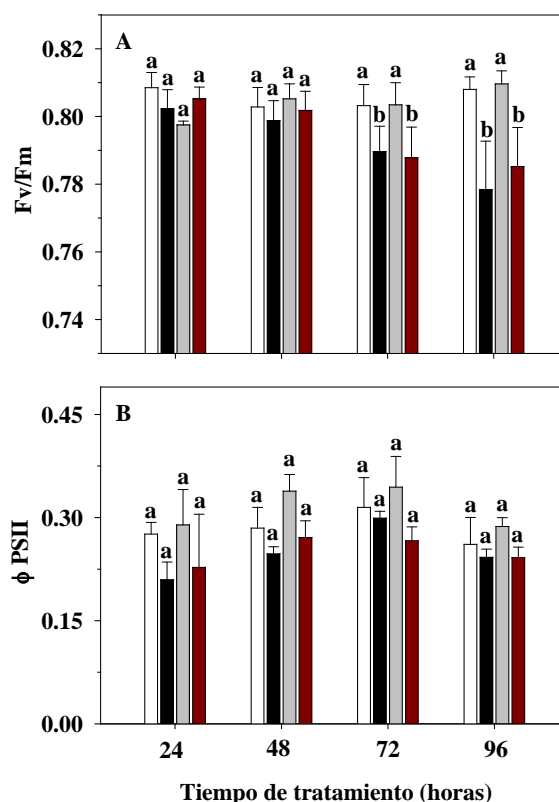
### III.2.3.3. Eficiencia del fotosistema II

Las medidas de fluorescencia de las clorofilas son ampliamente utilizadas para determinar los efectos de diferentes tipos de estreses ambientales en el aparato fotosintético

de las plantas (Guidi et al., 2008). Para determinar el efecto de la toxicidad de boro sobre este parámetro, se midió la eficiencia cuántica máxima de los centros de reacción del fotosistema II –PSII– ( $F_v/F_m$ ) y el rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ).

En la Figura 22A se representan los datos de la relación  $F_v/F_m$  en las plantas de arabidopsis de los genotipos silvestre y mutante *nced3* tratadas o no con boro 5 mM durante 96 horas. En las condiciones control, no hubo diferencias significativas en el ratio  $F_v/F_m$  entre ambos genotipos a lo largo del experimento. Sin embargo, en condiciones de toxicidad el ratio  $F_v/F_m$  disminuyó en los dos genotipos a partir de las 48 horas de tratamiento (Figura 22A).

En cuanto al  $\Phi_{PSII}$ , no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos y tratamientos (Figura 22B).



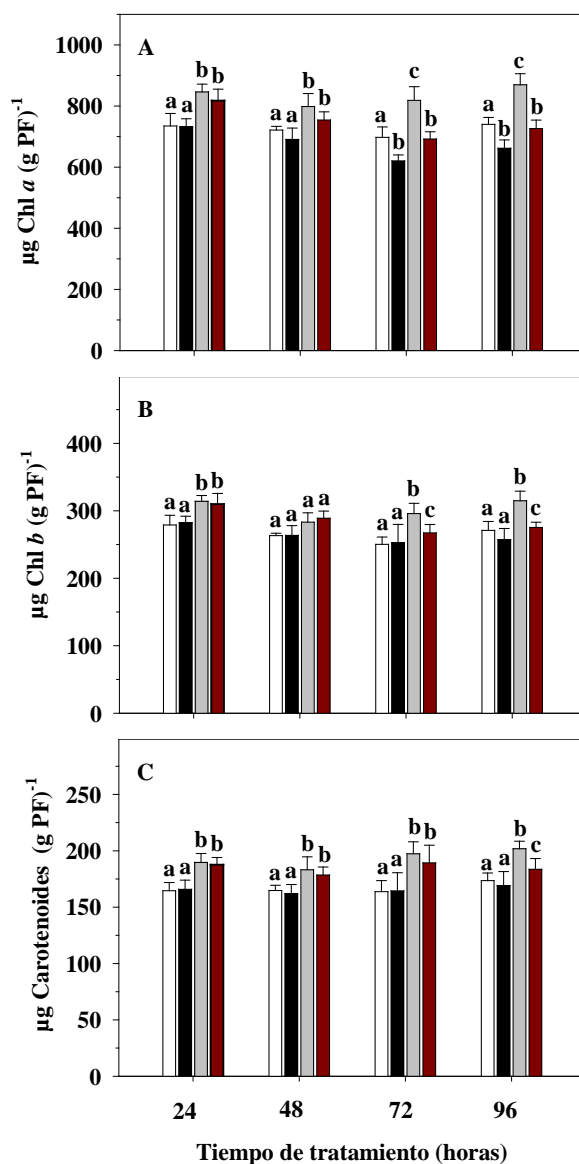
**Figura 22.** Efectos de la toxicidad de boro sobre la eficiencia cuántica máxima y el rendimiento cuántico del PSII en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de arabidopsis. Se determinaron la eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) (A) y el rendimiento cuántico ( $\Phi_{PSII}$ ) (B) en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre □; mutante ▒) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) durante 96 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).

#### III.2.3.4. Contenido de pigmentos fotosintéticos

La Figura 23 muestra la evolución de la concentración de las clorofilas *a* y *b* y carotenoides a lo largo de 96 horas de tratamiento con boro 10  $\mu$ M o 5 mM en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de arabidopsis.

Ambos genotipos tuvieron una concentración de clorofila *a* virtualmente constante durante el tratamiento control, si bien este parámetro fue mayor en el mutante *nced3*. Independientemente del genotipo, en condiciones de toxicidad se observó una disminución del contenido de clorofila *a* al final del tratamiento (Figura 23A).

La respuesta de los contenidos de clorofila *b* y carotenoides fue muy similar en ambos genotipos y tratamientos con boro (Figura 23B,C). Cabe resaltar que, como ya se observó para la clorofila *a*, las concentraciones de estos pigmentos fueron ligeramente mayores en el mutante *nced3* que en el genotipo silvestre (Figura 23B,C). Además, al final del experimento la toxicidad de boro causó una disminución tenue en los contenidos de clorofila *b* y carotenoides en el mutante *nced3*, hecho que no se observó en el genotipo silvestre (Figura 23B,C).

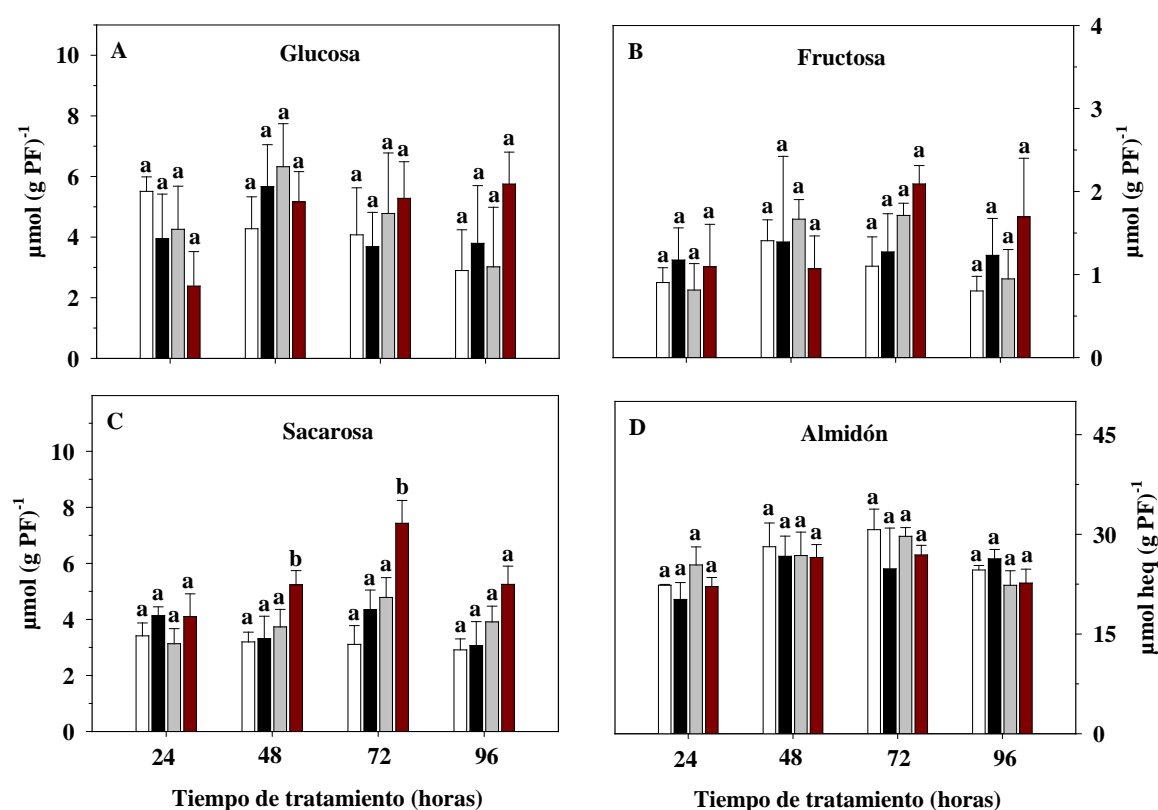


**Figura 23.** Efectos de la toxicidad de boro sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*. Se determinaron los contenidos de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) y carotenoides (C) en condiciones control (boro 10 µM; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) durante 96 horas. Los resultados representan la media ± SD de los análisis de cinco muestras de vástagos de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor < 0,01).

## III.2.3.5. Concentración de carbohidratos

La concentración de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón en las hojas de las plantas tratadas con boro 10  $\mu\text{M}$  no varió significativamente entre los genotipos silvestre y mutante *nced3* en el transcurso del experimento (Figura 24).

En condiciones de toxicidad de boro es interesante destacar el aumento que experimentaron los niveles foliares de sacarosa en el mutante *nced3* a las 48 y 72 horas de tratamiento (Figura 24C). Respecto a los niveles foliares de almidón, no se observaron cambios importantes en respuesta a la toxicidad de boro en ambos genotipos (Figura 24D).



**Figura 24.** Efectos de la toxicidad de boro sobre los contenidos foliares de carbohidratos en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *Arabidopsis*. Se determinaron los contenidos de glucosa (A), fructosa (B), sacarosa (C) y almidón (D) en condiciones control (boro 10  $\mu\text{M}$ ; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) durante 96 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de vástagos de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor < 0,05).

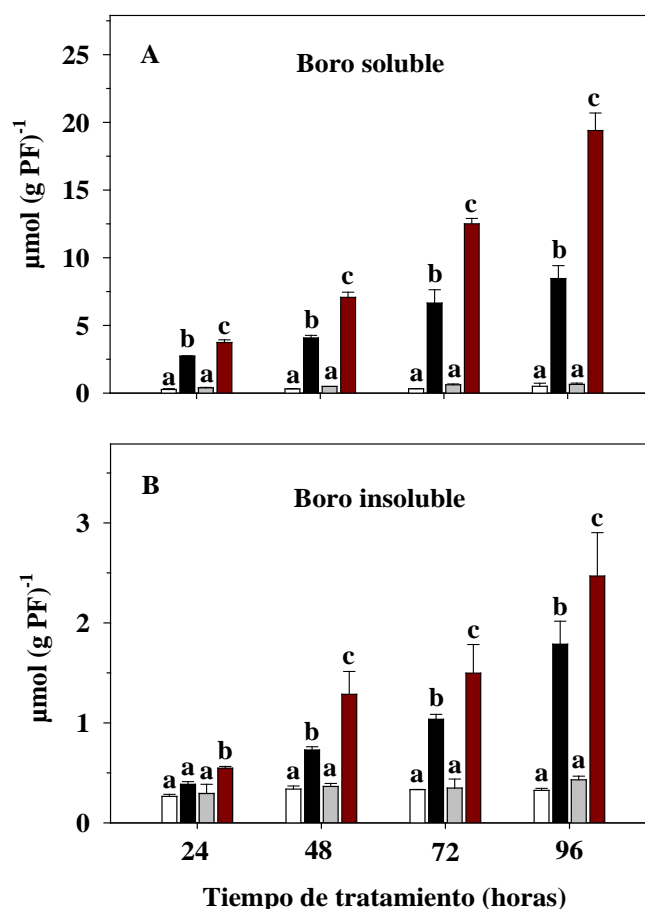
#### III.2.4. Efecto de la toxicidad de boro sobre el contenido de boro

En la Figura 25 se representan las variaciones en las concentraciones foliares de boro soluble e insoluble de plantas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis* tratadas o no con toxicidad de boro durante 96 horas.

En las plantas de ambos genotipos cultivadas en condiciones control la concentración foliar de boro soluble a lo largo del tratamiento fue muy similar [alrededor de  $0,40 \mu\text{mol (g PF)}^{-1}$ ] (Figura 25A). Como era de esperar, en las plantas tratadas con exceso de boro la concentración de boro soluble aumentó de forma significativa en los dos genotipos desde las 24 horas hasta el final del experimento (Figura 25A). No obstante, es interesante destacar que el mutante *nced3* mostró una mayor concentración de boro soluble que el genotipo silvestre desde las 48 horas de tratamiento de toxicidad (Figura 25A). Así, la concentración de boro soluble al final del tratamiento de toxicidad fue de aproximadamente 8 y  $20 \mu\text{mol (g PF)}^{-1}$  en los genotipos silvestre y mutante *nced3*, respectivamente (Figura 25A).

El contenido foliar de boro insoluble en las plantas de ambos genotipos permaneció casi constante y con valores similares a lo largo del tratamiento control (Figura 25B). Sin embargo, en las plantas tratadas con toxicidad, la concentración de boro insoluble aumentó en ambos genotipos (Figura 25B), especialmente desde las 48 horas de tratamiento. No obstante, las concentraciones de boro insoluble alcanzadas con el tratamiento de toxicidad fueron menores que las de boro soluble (Figura 25A,B). Como ocurrió con el boro soluble, el mutante *nced3* tuvo un mayor contenido de boro insoluble que el genotipo silvestre en condiciones de toxicidad (Figura 25B).

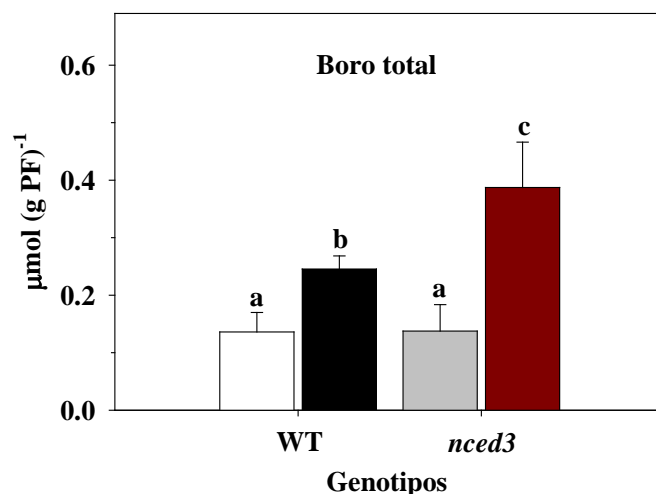




**Figura 25.** Efectos de la toxicidad de boro sobre los contenidos foliares de boro soluble e insoluble en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de arabidopsis. Se determinaron las concentraciones de boro soluble (A) y de boro insoluble (B) en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) durante 96 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de vástagos de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).

En la Figura 26 se representa la concentración de boro total en las raíces de plantas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* sometidas o no a 96 horas de toxicidad de boro. En condiciones control no se observaron diferencias significativas en el contenido de boro total entre las raíces de ambos genotipos (Figura 26).

En las plantas tratadas con toxicidad hubo un aumento significativo de la concentración de boro total en las raíces de ambos genotipos, siendo mayor en el mutante *nced3* (Figura 26).

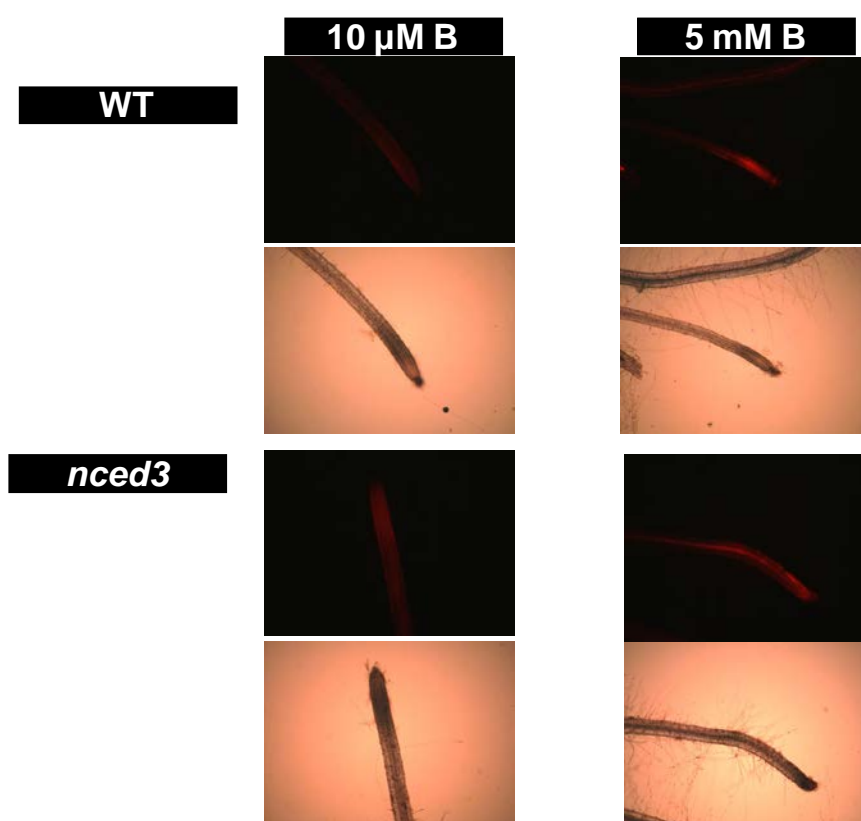


**Figura 26.** Efecto de la toxicidad de boro sobre el contenido radical de boro total en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de arabis. Se determinaron las concentraciones de boro total en condiciones control (boro 10 μM; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) tras 96 horas de tratamientos. Los resultados representan la media ± SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor < 0,05).

### III.2.5. Efecto de la toxicidad de boro sobre el estrés oxidativo

#### III.2.5.1. Análisis histoquímico de la producción de anión superóxido

Para estas determinaciones las raíces de arabidopsis se tiñeron con dihidroetidio – también conocido como hidroetidina–, que reacciona con el anión superóxido y emite fluorescencia. En condiciones control, las raíces del genotipo mutante *nced3* mostraron mayor intensidad de fluorescencia que las del genotipo silvestre (Figura 27). Tras 96 horas de tratamiento con toxicidad de boro ambos genotipos tuvieron mayores niveles de fluorescencia (Figura 27). En el mutante la tinción se localizó principalmente alrededor del cilindro central, mientras que en el genotipo silvestre la fluorescencia se observó principalmente en la zona meristemática de la raíz (Figura 27).

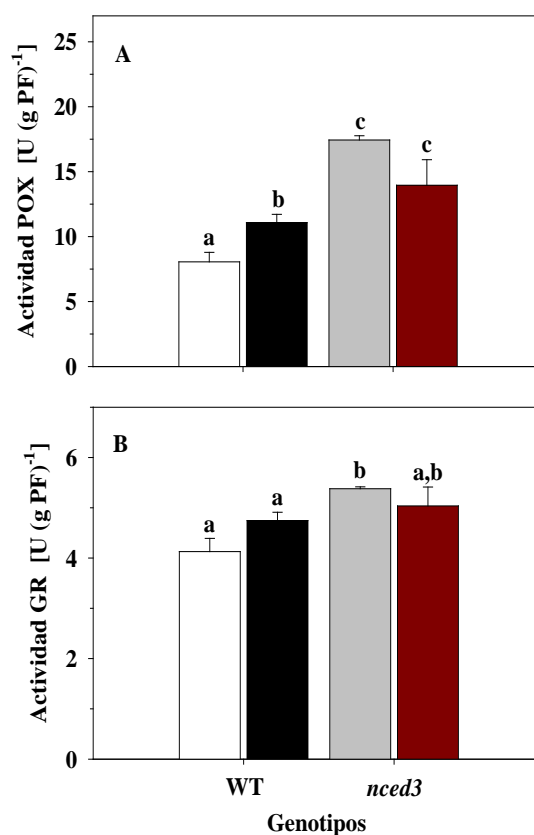


**Figura 27.** Efecto de la toxicidad de boro sobre la producción de anión superóxido en los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* de arabidopsis. La tinción con dihidroetidio fue analizada en las raíces de plantas de ambos genotipos cultivadas en condiciones control (boro 10  $\mu$ M) o de toxicidad de boro (5 mM) tras 96 horas de tratamientos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con al menos 10 plántulas para cada genotipo y tratamiento.

### III.2.5.2. Actividades peroxidasa y glutatión reductasa

En la Figura 28 se representa la actividad de las enzimas peroxidasa (POX) (Figura 28A) y glutatión reductasa (GR) (Figura 28B) en hojas de plantas de ambos genotipos tratadas o no durante 96 horas con toxicidad de boro. En el tratamiento control la actividad POX fue 2,6 veces superior en el mutante *nced3* que en el genotipo silvestre (Figura 28A). En condiciones de toxicidad de boro la actividad POX aumentó en el genotipo silvestre, mientras que disminuyó en el mutante *nced3* (Figura 28A).

Respecto a la actividad GR, se observó que en condiciones control el mutante *nced3* mostró niveles mayores que el genotipo silvestre (Figura 28B). En condiciones de toxicidad de boro no se apreciaron cambios significativos de la actividad GR en ambos genotipos, siendo ligeramente mayores los de mutante (Figura 28B).

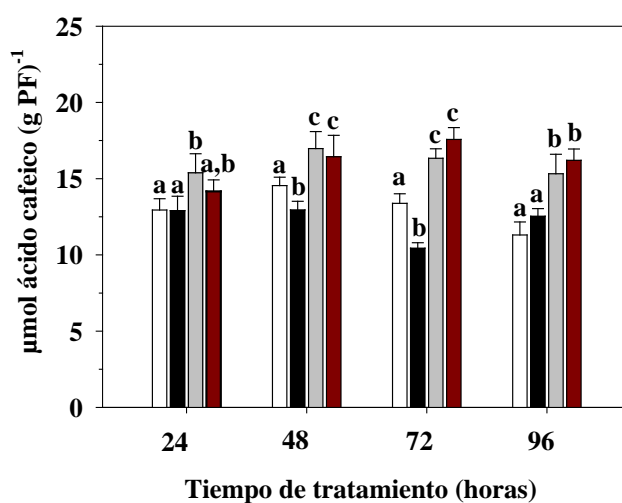


**Figura 28.** Efectos de la toxicidad de boro sobre las actividades foliares de las enzimas peroxidasa (POX) y glutatión reductasa (GR) en los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* de arabisopsis. Se determinaron las actividades POX (A) y GR (B) en condiciones control (boro 10  $\mu\text{M}$ ; silvestre □; mutante ▒) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) tras 96 horas de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de vástagos de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

### III.2.5.3. Contenido total de fenoles en hojas

En la Figura 29 se muestran los resultados del efecto de la toxicidad de boro sobre la concentración total de fenoles en las hojas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis* a lo largo de 96 horas de tratamiento.

Es de destacar que el genotipo mutante, tanto con el tratamiento control como de toxicidad de boro, tuvo una concentración total de fenoles significativamente superior a la del genotipo silvestre (Figura 29). No obstante, no se puede concluir de estos resultados que la toxicidad de boro afecte al contenido total de fenoles.



**Figura 29.** Efecto de la toxicidad de boro sobre el contenido total de fenoles en las hojas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*. Se determinaron los contenidos totales de fenoles en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) durante 96 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de vástagos de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

### III.2.6. Efecto de la toxicidad de boro sobre los contenidos de los principales iones

Para estudiar los efectos de la toxicidad de boro sobre la acumulación de nutrientes en la planta, los contenidos foliares y radicales de los principales iones se analizaron en los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis* tratados o no con exceso de boro.

#### III.2.6.1. Contenido de aniones

En hojas, el nitrato destacó por ser el anión más abundante (Tabla 8). En las plantas cultivadas en condiciones control no se observaron diferencias significativas en los contenidos de nitrato y sulfato entre ambos genotipos. En cambio, en estas mismas condiciones los niveles de fosfato fueron superiores en el mutante *nced3* en comparación con el genotipo silvestre (Tabla 8). En las plantas tratadas con exceso de boro, en el genotipo silvestre no se apreciaron cambios significativos en los contenidos de aniones foliares, salvo un incremento en la concentración de fosfato (Tabla 8). Sin embargo, en las plantas del mutante *nced3* tratadas con toxicidad de boro se produjo un aumento significativo en los niveles foliares de nitrato, fosfato y sulfato tras 96 horas de tratamiento (Tabla 8), que fueron superiores a los presentes en el genotipo silvestre.

En cuanto al contenido de aniones en la raíz, el nitrato también fue el más abundante (Tabla 8). En las plantas cultivadas en condiciones control no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos (Tabla 8). En las plantas tratadas con toxicidad de boro, no se apreciaron cambios significativos en los niveles de nitrato y de fosfato. No obstante, hubo una reducción del contenido de sulfato en las raíces de ambos genotipos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Efectos de la toxicidad de boro sobre los contenidos foliares y radicales de nitrato, fosfato y sulfato en los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* de arabidopsis. Se determinaron los contenidos de estos aniones en condiciones control (boro 10  $\mu$ M) o de toxicidad de boro (5 mM) tras 96 horas de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

	HOJA		
	$\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$		
	$\text{NO}_3^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
<b>WT 10 <math>\mu</math>M B</b>	112,61 $\pm$ 4,48a	7,92 $\pm$ 0,71a	8,68 $\pm$ 0,28a
<b>WT 5 mM B</b>	119,92 $\pm$ 1,80a	10,22 $\pm$ 0,22b	8,33 $\pm$ 0,52a
<b><i>nced3</i> 10 <math>\mu</math>M B</b>	104,40 $\pm$ 2,38a	11,49 $\pm$ 0,63b	8,31 $\pm$ 0,12a
<b><i>nced3</i> 5 mM B</b>	122,31 $\pm$ 1,88b	14,22 $\pm$ 0,51c	10,70 $\pm$ 0,52b

	RAÍZ		
	$\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$		
	$\text{NO}_3^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
<b>WT 10 <math>\mu</math>M B</b>	41,44 $\pm$ 1,68a	12,64 $\pm$ 0,61a	19,64 $\pm$ 0,43a
<b>WT 5 mM B</b>	44,44 $\pm$ 0,27a	12,01 $\pm$ 0,09a	16,89 $\pm$ 0,16b
<b><i>nced3</i> 10 <math>\mu</math>M B</b>	46,89 $\pm$ 0,60a	14,51 $\pm$ 0,14a	19,63 $\pm$ 0,05a
<b><i>nced3</i> 5 mM B</b>	44,01 $\pm$ 1,20a	12,81 $\pm$ 0,23a	16,14 $\pm$ 0,43b

### III.2.6.2. Contenido de cationes

En hojas, los cationes más abundantes fueron el calcio junto con el magnesio (Tabla 9). En condiciones control, el mutante *nced3* presentó menores niveles de potasio, mientras que fueron mayores los contenidos de magnesio y de calcio en comparación con el genotipo silvestre (Tabla 9). La toxicidad de boro causó una disminución significativa en los niveles de potasio en el genotipo silvestre, pero no produjo cambios significativos en el resto de los cationes analizados tanto en el genotipo silvestre como en el mutante *nced3* (Tabla 9).

En cuanto a los niveles de cationes en las raíces, el potasio fue claramente el catión más abundante (Tabla 9). En condiciones control, el mutante *nced3* mostró niveles de potasio menores y mayores de magnesio en comparación con el genotipo silvestre (Tabla 9). En las plantas tratadas con toxicidad de boro, se observó una disminución significativa en los niveles radicales de calcio y de magnesio, tanto en el genotipo silvestre como en el mutante *nced3* (Tabla 9).

**Tabla 9.** Efectos de la toxicidad de boro sobre los contenidos foliares y radicales de potasio, magnesio y calcio en los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* de arabidopsis. Se determinaron los contenidos de estos cationes en condiciones control (boro 10  $\mu\text{M}$ ) o de toxicidad de boro (5 mM) tras 96 horas de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

	HOJA		
	$\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$		
	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
<b>WT 10 <math>\mu\text{M B}</math></b>	70,85 $\pm$ 5,18a	93,32 $\pm$ 7,89a	94,61 $\pm$ 2,68a
<b>WT 5 mM B</b>	43,13 $\pm$ 5,12b	98,05 $\pm$ 1,76a	94,59 $\pm$ 2,17a
<b><i>nced3</i> 10 <math>\mu\text{M B}</math></b>	55,07 $\pm$ 3,29c	114,30 $\pm$ 5,62b	119,54 $\pm$ 5,42b
<b><i>nced3</i> 5 mM B</b>	58,02 $\pm$ 9,87c	110,37 $\pm$ 5,94b	108,49 $\pm$ 7,65b

	RAÍZ		
	$\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$		
	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
<b>WT 10 <math>\mu\text{M B}</math></b>	102,08 $\pm$ 4,92a	25,16 $\pm$ 1,94a	25,86 $\pm$ 3,68a
<b>WT 5 mM B</b>	100,69 $\pm$ 4,73a	18,54 $\pm$ 1,94b	17,41 $\pm$ 1,75b
<b><i>nced3</i> 10 <math>\mu\text{M B}</math></b>	73,02 $\pm$ 13,62b	30,18 $\pm$ 3,12c	22,67 $\pm$ 1,24a
<b><i>nced3</i> 5 mM B</b>	83,70 $\pm$ 9,70b	20,34 $\pm$ 3,17b	17,49 $\pm$ 2,40b

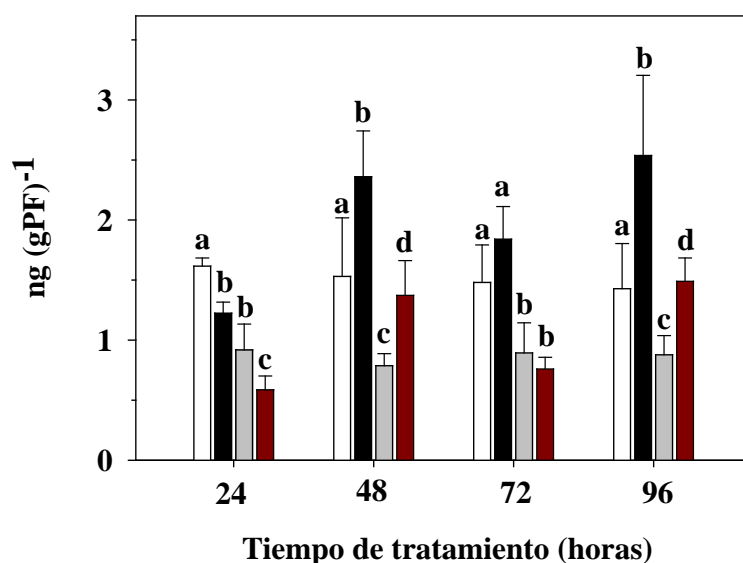
### III.2.7. Efecto de la toxicidad de boro sobre el nivel radical de ácido abscísico

El contenido de ácido abscísico (ABA) se analizó en las raíces de plantas de arabidopsis de los genotipos silvestre y mutante *nced3* tratadas o no con toxicidad de boro durante 96 horas (Figura 30). Es interesante destacar que, en condiciones control, la concentración de ABA del mutante *nced3* fue significativamente menor que la del genotipo silvestre a lo largo del experimento (Figura 30).

En las plantas tratadas con exceso de boro, los niveles radicales de ABA descendieron en ambos genotipos tras 24 horas de tratamiento, especialmente en el mutante *nced3* (Figura



30). Sin embargo, la concentración de ABA aumentó en las raíces de ambos genotipos a las 48 y 96 horas de tratamiento con toxicidad de boro (Figura 30).



**Figura 30.** Efecto de la toxicidad de boro sobre el contenido de ácido abscísico (ABA) en las raíces de los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*. Se determinaron los contenidos de ABA en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre  $\square$ ; mutante  $\blacksquare$ ) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre  $\blacksquare$ ; mutante  $\blacksquare$ ) durante 96 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos en cada tiempo según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

### **III.3. ANÁLISIS DEL TRANSPORTE DE AGUA EN LOS GENOTIPOS SILVESTRE Y MUTANTE *nced3* DE ARABIDOPSIS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR TOXICIDAD DE BORO**

#### **III.3.1. Efecto de la toxicidad de boro sobre el transporte de agua hacia el vástago**

Para determinar los efectos de la toxicidad de boro en la translocación de agua desde la raíz a las hojas se utilizó deuterio como elemento traza para estudiar la cinética de absorción y el flujo de agua.

La translocación de agua desde las raíces hasta las partes aéreas de las plantas de los genotipos silvestre y mutante *nced3* fue analizada durante 24 horas mediante la determinación del contenido de deuterio en el agua de las hojas de la roseta. En la Figura 31 se representan las curvas de absorción de deuterio para ambos genotipos y tratamientos. Para la realización de estas curvas se modelaron los valores reales según se describe en Da Ines et al. (2010).

El flujo relativo de agua ( $q_{hoja}$ ) se dedujo mediante el análisis de regresión de la fase inicial (0-120 minutos) de los datos modelados de absorción de deuterio (Figura 32). En la Figura 32, Y viene determinado por la ecuación (ver Materiales y Métodos, II.7):

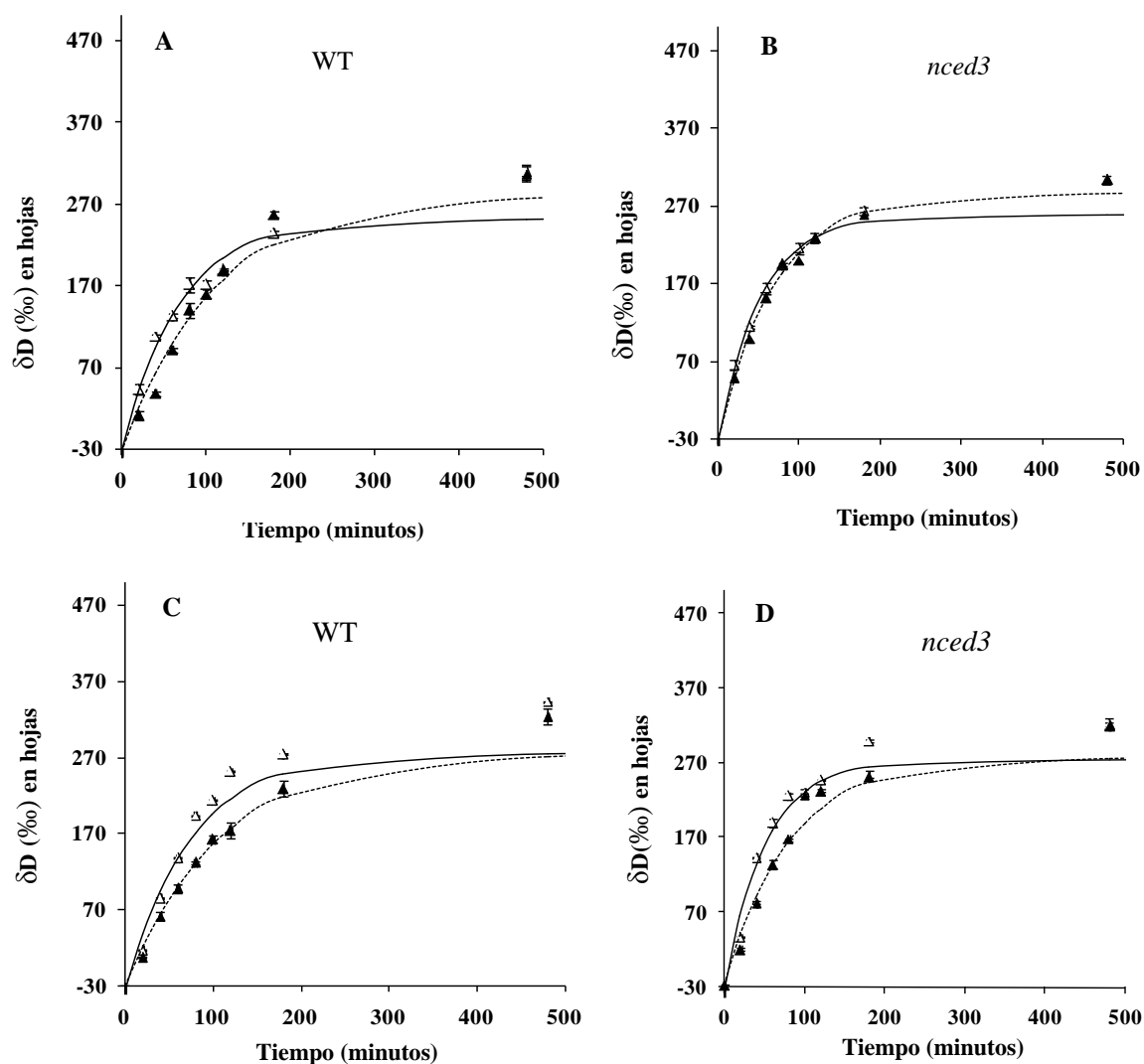
$$\frac{1}{a} \cdot \ln \left( \frac{R_{hoja,0} - R_{hoja,SS}}{R_{hoja}(t) - R_{hoja,SS}} \right) = Y$$

es decir,

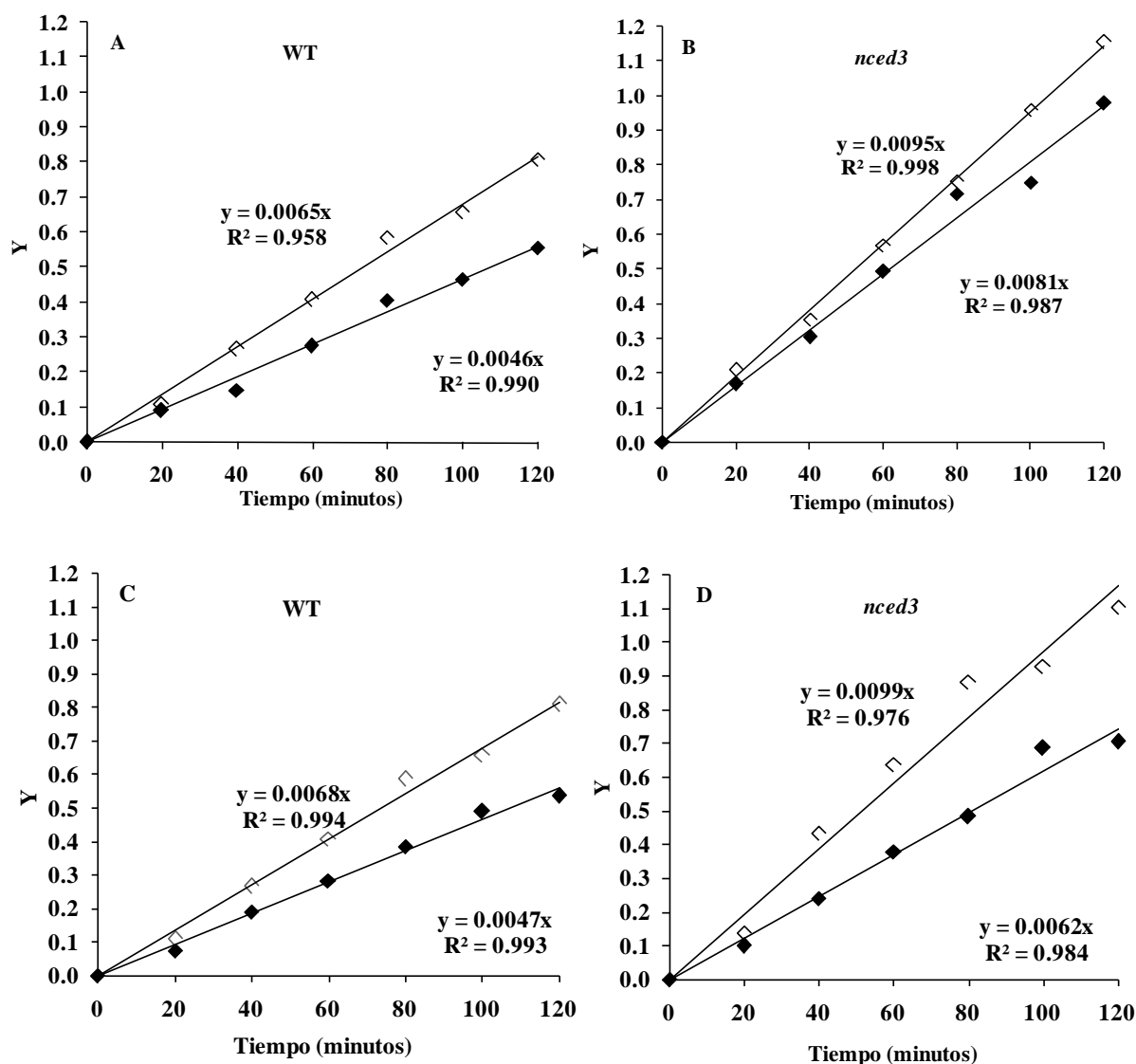
$$Y = q_{hoja} \cdot t$$

Así, por ejemplo,  $q_{hoja}$  en condiciones control fue de  $0,0065 \text{ min}^{-1}$  y de  $0,0095 \text{ min}^{-1}$  tras 24 horas de tratamiento en los genotipos silvestre y mutante *nced3*, respectivamente (Figura 32A,B).

Es de destacar que, tanto a las 24 como a las 48 horas de tratamientos,  $q_{hoja}$  del mutante *nced3* fue claramente mayor que el del genotipo silvestre (Figura 32). Además, la toxicidad de boro redujo  $q_{hoja}$  en ambos genotipos, reducción que fue más acusada a las 48 horas de tratamiento en el mutante *nced3* (Figura 32).



**Figura 31.** Efectos de la toxicidad de boro sobre las curvas de absorción de deuterio en los genotipos silvestre (A, C) y mutante *nced3* (B, D) de *arabidopsis*. Se determinaron los contenidos de deuterio en las rosetas y a partir de estos datos se calcularon las curvas de absorción reales ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) y modeladas (—, ---) según el método descrito por Da Ines et al. (2010). Se representan ambos tipos de curvas obtenidas en condiciones control (boro 10  $\mu$ M;  $\Delta$ , —) o de toxicidad de boro (5 mM;  $\blacktriangle$ , ---) tras 24 (A, B) y 48 horas (C, D) de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de tres plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento.

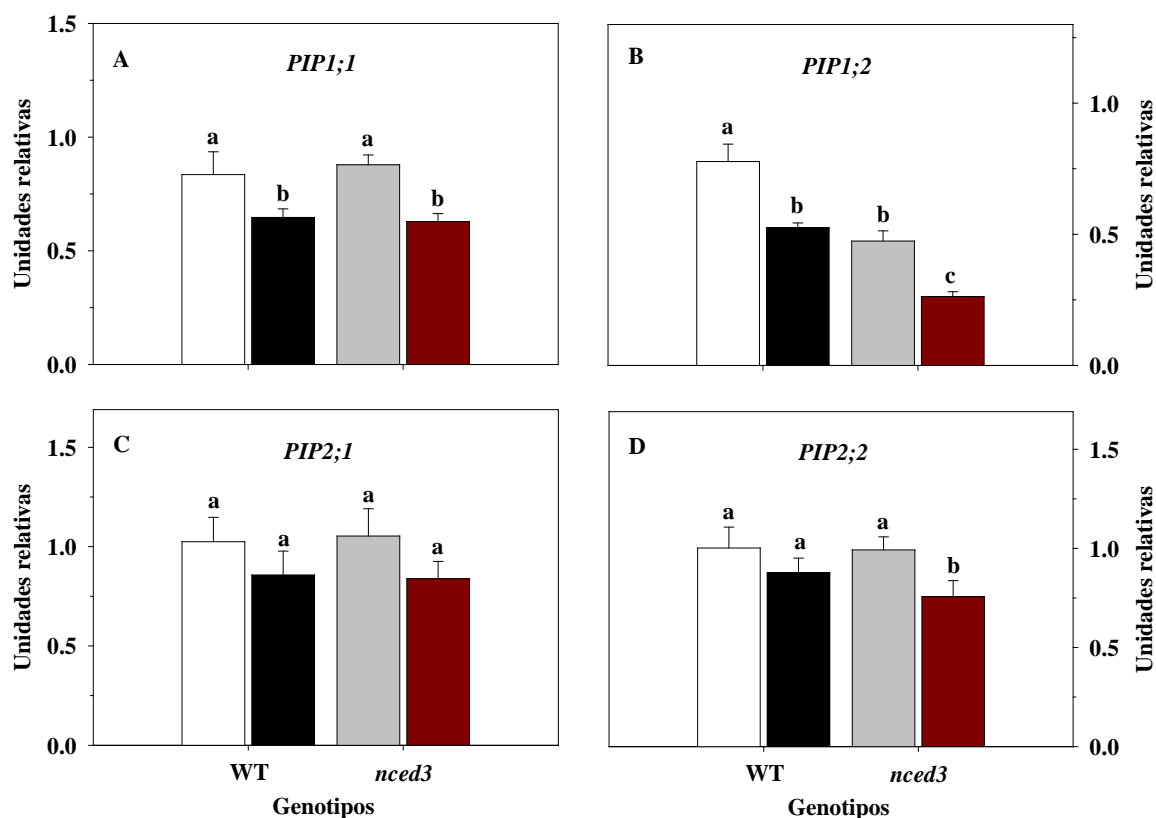


**Figura 32.** Efecto de la toxicidad de boro sobre el flujo relativo de agua ( $q_{hoja}$ ) en los genotipos silvestre (A, C) y mutante *nced3* (B, D) de arabidopsis. Se determinaron los análisis de regresión de la fase lineal (0-120 minutos) de absorción a partir de los datos de la Figura 31 de donde se obtuvieron los respectivos valores Y, según se describe en Materiales y Métodos (apartado II.7). Se representan los análisis de regresión obtenidos en condiciones control (boro 10  $\mu$ M;  $\diamond$ ) o de toxicidad de boro (5 mM;  $\blacklozenge$ ) tras 24 (A, B) y 48 horas (C, D) de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de tres plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento.

### III.3.2. Efecto de la toxicidad de boro sobre la expresión de genes de acuaporinas

Para investigar si la reducción en la translocación de agua causada por la toxicidad de boro está relacionada con la modificación de los niveles de acuaporinas, se llevó a cabo un estudio a nivel transcripcional de algunas acuaporinas presentes en la raíz de *arabidopsis* que son importantes para el transporte de agua.

Se analizaron mediante Q-RT-PCR a tiempo real los niveles de transcritos de los genes *PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP2;1* y *PIP2;2* en las raíces de los genotipos silvestre y mutante *nced3* tratadas o no con toxicidad de boro durante 24 horas (Figura 33). En condiciones control, es interesante destacar que el mutante *nced3* presentó menores niveles de transcritos del gen *PIP1;2* que el genotipo silvestre (Figura 33B), mientras que los niveles de expresión de los genes *PIP1;1*, *PIP2;1* y *PIP2;2* fueron similares en ambos genotipos (Figura 33A,C,D). En condiciones de toxicidad de boro, el gen *PIP1;1* redujo sus niveles de expresión en un porcentaje parecido en los genotipos silvestre y mutante *nced3* (Figura 33A). Sin embargo, aunque los niveles de expresión del gen *PIP1;2* se redujeron también con la toxicidad de boro en ambos genotipos tras 24 horas de tratamiento, su nivel de expresión fue significativamente menor en el mutante *nced3* en comparación con el del genotipo silvestre (Figura 33B). Por último, cabe destacar que la toxicidad de boro disminuyó significativamente los niveles de expresión del gen *PIP2;2* solo en el mutante *nced3* (Figura 33D).



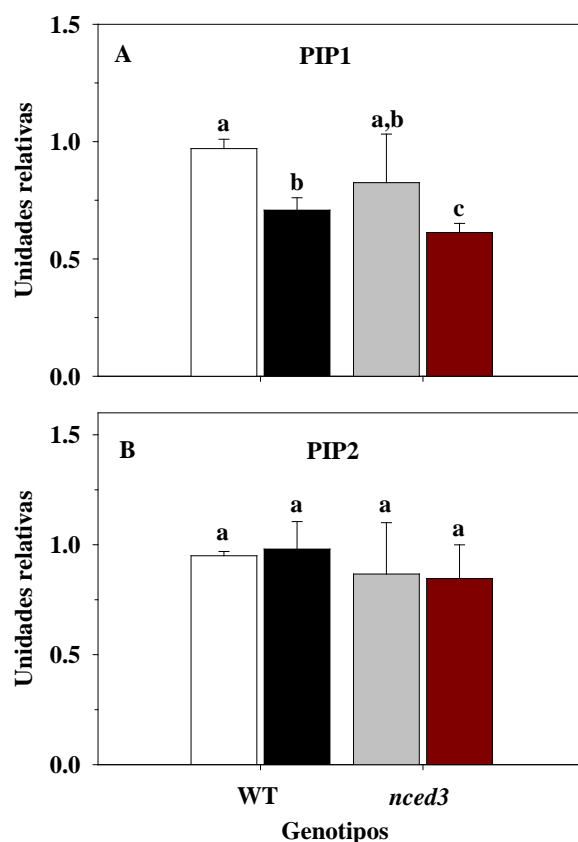
**Figura 33.** Efectos de la toxicidad de boro sobre los niveles de transcritos de genes relacionados con el transporte de agua en las raíces de los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* de arabidopsis. Se determinaron mediante Q-RT-PCR a tiempo real los niveles de transcritos de los genes *PIP1;1* (A), *PIP1;2* (B), *PIP2;1* (C) y *PIP2;2* (D) en las raíces de plantas en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre □; mutante ■) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre ■; mutante ■) tras 24 horas de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor < 0,01).

### III.3.3. Efecto de la toxicidad de boro sobre los contenidos de las proteínas PIP1 y PIP2

Con el fin de investigar si la toxicidad de boro ejerce cambios en los niveles de proteínas transportadoras de agua, se realizó una cuantificación de la abundancia de las acuaporinas PIP1 y PIP2. Para ello, se aislaron las fracciones microsomales de las raíces de las plantas de *arabidopsis* de los genotipos silvestre y mutante *nced3* cultivadas en hidroponía y tratadas o no durante 48 horas con toxicidad de boro. En las fracciones microsomales se cuantificó la abundancia de acuaporinas utilizando anticuerpos específicos para las proteínas PIP1 y PIP2 (ELISA) (Figura 34).

En condiciones control no hubo diferencias significativas en el contenido de acuaporinas PIP1 y PIP2 entre ambos genotipos (Figura 34).

En condiciones de toxicidad de boro, ambos genotipos tuvieron un descenso en los niveles de la acuaporina PIP1 (Figura 34A), mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de la acuaporina PIP2 (Figura 34B).



**Figura 34.** Efectos de la toxicidad de boro sobre los niveles de acuaporinas PIP1 y PIP2 en las raíces de los genotipos silvestre (WT) y mutante *nced3* de arabidopsis. Se determinaron los niveles de proteínas PIP1 (A) y PIP2 (B) en las fracciones microsomales aisladas de las raíces de plantas en condiciones control (boro 10  $\mu$ M; silvestre  $\square$ ; mutante  $\blacksquare$ ) o de toxicidad de boro (5 mM; silvestre  $\blacksquare$ ; mutante  $\blacksquare$ ) tras 48 horas de tratamientos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de los análisis de cinco muestras de raíces de plantas diferentes para cada genotipo y tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y tratamientos según la t-Student ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).



## **IV. DISCUSIÓN**

#### **IV.1. LA TOXICIDAD DE BORO REDUCE EL CRECIMIENTO DE LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS DE ARABIDOPSIS**

En las plantas vasculares, la raíz es el órgano principal encargado de la absorción del agua y de los nutrientes del suelo necesarios para el desarrollo. Es, por tanto, el órgano vegetal que primero percibe los cambios en las concentraciones de nutrientes del suelo. El desarrollo del sistema radical se caracteriza por su gran plasticidad en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (López-Bucio et al., 2003). Así, por ejemplo, una deficiencia en fósforo reduce el crecimiento de la raíz principal pero aumenta el de las raíces secundarias en plántulas de *arabidopsis* (Camacho-Cristóbal et al., 2008). Sin embargo, un bajo aporte de boro inhibe el crecimiento de la raíz principal sin afectar al de las raíces secundarias (Martín-Rejano et al., 2011). Estos cambios en la arquitectura radical pueden afectar gravemente a la capacidad de las plantas para tomar agua y nutrientes.

El exceso de nutrientes normalmente conlleva una inhibición en el crecimiento del sistema radical. Por ejemplo, se ha demostrado que un exceso de cobre en el medio produce una desorganización de la cutícula de la raíz y reduce la proliferación de pelos radicales y el tamaño del sistema radical (Sheldon y Menzies, 2005). También se ha puesto de manifiesto que la toxicidad de otros nutrientes como el manganeso (Mou et al., 2011), amonio (Britto y Kronzucker, 2002) y sodio (Flowers et al., 1991) causa una inhibición del crecimiento radical. En las plantas vasculares, una de las respuestas más rápidas a la toxicidad de boro es la inhibición del crecimiento de las raíces (Nable, 1988; Reid et al., 2004; Choi et al., 2007). En este trabajo, la toxicidad de boro causó una reducción significativa del crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales en ambos genotipos de *arabidopsis* estudiados (Figura 17A,B). Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos previos sobre los efectos de la toxicidad de boro en el crecimiento de las raíces de cebada (Karabal et al., 2003) y garbanzo (Ardic et al., 2009).

El crecimiento del sistema radical al completo depende de dos procesos: la división y la elongación celulares (Takatsuka y Umeda, 2014). Las hormonas más importantes en el control de estos procesos son las auxinas y citoquininas (Schaller et al., 2015), si bien otras hormonas como las giberelinas, el ABA y el etileno han mostrado tener capacidad moduladora del sistema radical (Jun y McCouch, 2013). Se ha propuesto que la rápida inhibición del crecimiento radical derivada de la toxicidad de boro se debe a alteraciones en la homeostasis hormonal que causan modificaciones en el patrón de división y elongación de las células de la raíz (Liu et al., 2000; Aquea et al., 2012). En plántulas de *arabidopsis*, la

toxicidad de boro causó una reducción en el tamaño del meristemo radical como consecuencia de una disminución de la actividad mitótica (Aquea et al., 2012). Este efecto fue atribuido a un descenso de los niveles de expresión de genes que codifican reguladores positivos (ciclinas, ciclinas dependientes de quinasas y factores de transcripción) del ciclo celular en las primeras horas del tratamiento de toxicidad en boro (Aquea et al., 2012). No obstante, los niveles de expresión de estos reguladores del ciclo celular disminuyeron hasta los valores control tras 24 horas de tratamiento de toxicidad de boro (Aquea et al., 2012). Sin embargo, en el presente trabajo se observó un aumento en los niveles de expresión de diversos genes que codifican ciclinas en las raíces de las plantas tratadas con toxicidad de boro durante 24 horas (Tabla 6). Este hecho podría relacionarse con un mecanismo para mantener el crecimiento radical en condiciones de estrés, ya que los niveles de expresión de ciclinas han sido positivamente relacionados con el crecimiento de la raíz (Doerner et al., 1996). Además, el incremento observado en los niveles de expresión de genes relacionados con la señalización de citoquininas en condiciones de toxicidad de boro (Tabla 6) también podría relacionarse con este mecanismo, ya que las citoquininas controlan la transición de las células desde la zona de división hasta la de elongación y diferenciación en raíces de *arabidopsis* (Dello Ioio et al., 2007). Interesantemente, esta capacidad para mantener el crecimiento radical bajo condiciones de estrés ha sido identificada como un mecanismo de tolerancia a la toxicidad de boro en cebada (*Hordeum vulgare*) (Choi et al., 2007) y a la toxicidad de manganeso en vid (Mou et al., 2011).

Por otro lado, la elongación celular desempeña una importante función en la modulación del crecimiento de las raíces. Se ha demostrado que el etileno causa un bloqueo en la elongación celular a partir del cual las células no pueden expandirse; este bloqueo es irreversible a nivel celular, pero completamente reversible a nivel de órgano (Le et al., 2001; Swarup et al., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la toxicidad de boro incrementó los niveles de expresión de los genes *ACS11* (importante en la síntesis de etileno) y *EIN2* (importante en la señalización de etileno) en raíces (Figura 9A,B), lo que sugiere que este estrés causa un incremento de etileno que inhibiría la elongación de la raíz. Estudios recientes han demostrado que la deficiencia de boro provoca una rápida sobreexpresión del gen *ACS11* en las raíces de las plántulas de *arabidopsis*, hecho que se ha relacionado con un aumento en los niveles de etileno y con la inhibición de la elongación de las células radicales (Martin-Rejano, 2014). Además, en *arabidopsis* también se ha descrito

que la inhibición de la elongación de la raíz causada por un exceso de aluminio está mediada por un rápido aumento en los niveles de etileno (Sun et al., 2010).

#### **IV.2. LA TOXICIDAD DE BORO MODIFICA LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE INTERVIENEN EN LA BIOSÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ABA**

El ABA desempeña un papel muy importante en la regulación del desarrollo y la adaptación de las plantas a diferentes condiciones adversas (Wilkinson y Hartung, 2009). La percepción inicial de diferentes tipos de estreses abióticos como, por ejemplo, la sequía o el exceso de salinidad inducen cambios en la expresión génica que llevan a un aumento de los niveles de ABA (Zhang et al., 2006). Los resultados obtenidos mediante microarrays y Q-RT-PCR a tiempo real mostraron un incremento de la expresión de los genes *NCED3*, *ABI1* y *ABI2* en las raíces de arabidopsis a partir de 6 horas de tratamiento con toxicidad de boro (Tabla 6 y Figura 8). Estos resultados sugieren que el ABA desempeña una función importante en la modulación de la respuesta de arabidopsis al estrés producido por la toxicidad de boro. Otros autores también han destacado el papel del ABA en este tipo de estrés abiótico; así, Aquea et al. (2012) observaron en las raíces de arabidopsis que la mayoría de los genes regulados positivamente por la toxicidad de boro estaban relacionados con la respuesta a ABA.

El ABA es sintetizado *de novo* en respuesta a diferentes tipos de estreses (Peleg y Blumwald, 2011). Como se ha comentado en la Introducción, la enzima clave en la biosíntesis de ABA es la 9 cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), la cual cataliza la conversión de neoxantina o violaxantina en xantonina (Schwartz et al., 1997). Los genes que codifican la enzima NCED fueron identificados por primera vez en plantas de maíz (*Zea mays*) mediante la caracterización del mutante *vp14* (viviparous14) (Tan et al., 1997). El análisis de secuencias homólogas a este gen *NCED* de maíz ha permitido identificar familias génicas que codifican distintas isoenzimas NCED en otras especies de plantas como *Phaseolus vulgaris* (Qin y Zeevaart, 1999), *Vigna unguiculata* (Iuchi et al., 2000) y *Arabidopsis thaliana* (Neill et al., 1998; Iuchi et al., 2001).

En *A. thaliana* la enzima NCED está codificada por seis genes denominados *NCED2*, *NCED3*, *NCED4*, *NCED5*, *NCED6* y *NCED9*. Los genes *NCED5*, *NCED6* y *NCED9* intervienen en la dormición de las semillas (Frey et al., 2012). En plantas de arabidopsis se ha

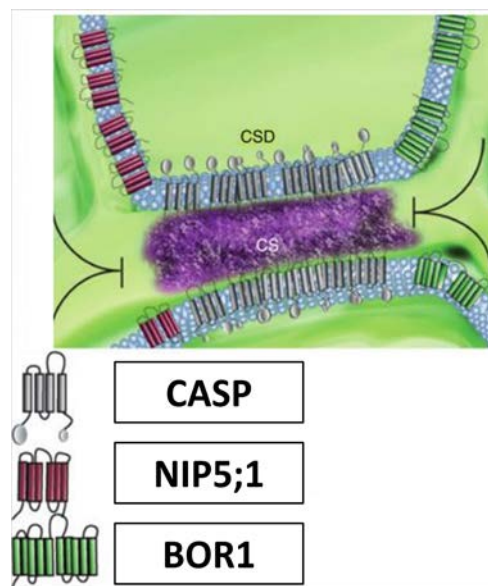
demostrado que la sequía induce la expresión del gen *NCED3*, el cual controla los niveles endógenos de ABA bajo este tipo de estrés (Iuchi et al., 2001). Además, la sobreexpresión del gen *NCED3* confirió una mayor tolerancia al estrés producido por la sequía en plantas de *A. thaliana* debido a un aumento en los niveles de ABA (Iuchi et al., 2001). Estos resultados sugieren la existencia de una correlación positiva entre los niveles de expresión del gen *NCED3* y los de ABA (Iuchi et al., 2001; Frey et al., 2012). La importancia del gen *NCED3* para la biosíntesis de ABA se pone de manifiesto en el mutante *nced3*, el cual tiene reducidos los niveles radicales de ABA en comparación con las plantas del genotipo silvestre (Figura 30; Iuchi et al., 2001; Frey et al., 2012). Además, los bajos niveles de ABA en este mutante estarían relacionados con el menor tamaño de su roseta con respecto a la del genotipo silvestre (Figura 18B; Frey et al., 2012).

Interesantemente la toxicidad de boro incrementó los niveles de ABA a partir de las 48 horas de tratamiento no solo en el genotipo silvestre, sino también en el mutante (Figura 30). Este resultado pone de manifiesto que el gen *NCED3* no sería el único de la familia de los genes *NCED* que contribuye al aumento de los niveles de ABA bajo condiciones de toxicidad de boro. No obstante, durante las primeras 24 horas de toxicidad de boro los niveles radicales de ABA descendieron en ambos genotipos con respecto a los del tratamiento control (Figura 30). Esta situación podría estar causada por un aumento del transporte de ABA hacia las hojas. Así, por ejemplo, en condiciones de sequía se ha propuesto que el ABA derivado de la raíz es transportado vía xilema hasta las hojas, donde induce el cierre de los estomas (Wilkinson y Davies, 2002).

### **IV.3. LA TOXICIDAD DE BORO MODIFICA LA BANDA DE CASPARY**

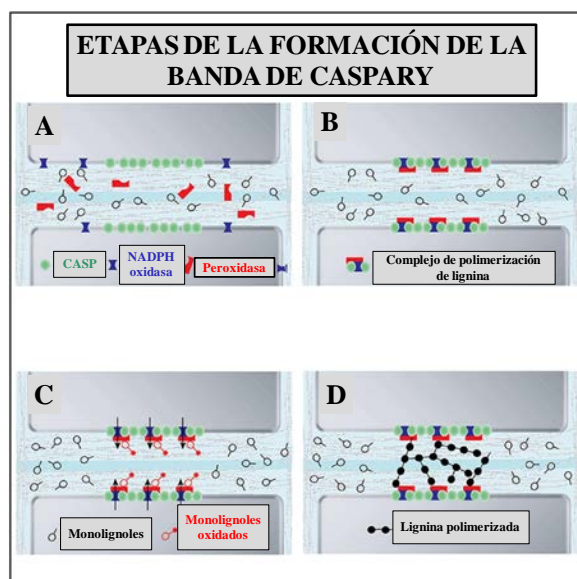
Las plantas terrestres son organismos sésiles, por lo que deben adaptarse a las modificaciones en las condiciones ambientales que puedan comprometer su supervivencia. Así, por ejemplo, las raíces poseen mecanismos de protección frente a estreses tanto bióticos (ataque de patógenos) como abióticos (exceso de nutrientes o de metales pesados) (Naseer et al., 2012). Uno de estos mecanismos lo constituye la banda de Caspary, estructura que se genera mediante la deposición de materiales de tipo lignocelulósicos en la pared celular primaria de la endodermis. Esta barrera interrumpe la libre difusión de agua y nutrientes a través del apoplasto, lo que favorece una absorción eficiente y selectiva de los nutrientes (Steudle et al., 2001).

Recientemente se ha identificado un dominio de la membrana plasmática subyacente a la banda de Caspary denominado zona de dominio de la banda de Caspary (CSD) (Figura 35; Roppolo y Geldner, 2012). Este dominio se caracteriza por no presentar proteínas transportadoras, y funciona como una barrera entre la parte de la membrana plasmática de las células endodérmicas orientada hacia el interior (cilindro central) y la orientada al exterior (córtez), donde se localizan diferentes transportadores de forma polarizada (Figura 35; Roppolo y Geldner, 2012).



**Figura 35.** Representación de la zona de dominio de la banda de Caspary. CSD (dominio de la banda de Caspary), CS (banda de Caspary), NIP5;1 (transportador de boro localizado en la membrana orientada hacia el córtex) y BOR1 (transportador de boro localizado en la membrana orientada hacia el cilindro central) (modificado de Roppolo y Geldner, 2012).

Se ha descrito que en el CSD de las raíces de *Arabidopsis* se localiza una familia de proteínas transmembrana denominadas CASP, las cuales son esenciales para la correcta formación de la banda de Caspary (Roppolo et al, 2011). Así, se ha demostrado que las proteínas CASP intervienen en la localización de las deposiciones de lignina necesarias para la formación de la banda de Caspary, si bien estas proteínas no han mostrado tener actividad enzimática *per se*. Por tanto, para dirigir las deposiciones de lignina se ha sugerido que las proteínas CASP interaccionan directamente con la maquinaria responsable de la biosíntesis de lignina (Figura 36; Lee et al., 2013). De hecho, se ha propuesto que las proteínas CASP funcionan como soporte para las NADPH oxidasas y peroxidasas que intervienen en la oxidación de los monolignoles que formarán la lignina (Figura 36; Lee et al., 2013).



**Figura 36.** Modelo para la deposición de lignina en la endodermis de la raíz (modificado de Lee et al., 2013).

La toxicidad de boro aumentó los niveles de transcritos de los genes *CASP4* y *CASP5* (Tabla 6, Figura 11D,E), así como de diferentes lacasas y peroxidasas (Tabla 6) que podrían intervenir en los procesos de lignificación de las raíces (Fagerstedt et al., 2010; Berthet et al., 2011, Liu, 2012; Zhao et al., 2013). Además, el exceso de boro también incrementó la actividad de las enzimas NADPH oxidasa y peroxidasa en las raíces de las plantas tras 24 horas de tratamiento (Figura 14). Estos resultados, junto con el aumento de la autofluorescencia emitida por la banda de Caspary observado en las raíces de las plantas tratadas con toxicidad de boro durante 24 horas (Figura 13), sugieren que dicha toxicidad provoca un aumento del tamaño de la banda de Caspary. Esta hipótesis concuerda con los resultados de estudios previos realizados en plantas de soja que sugieren que la toxicidad de boro induce la formación de una hipodermis de suberina que limita el flujo radial de agua hacia el interior de la raíz (Ghanati et al., 2005). En este sentido, se ha sugerido que la banda de Caspary presenta cierta plasticidad ya que puede aumentar de tamaño cuando las plantas son sometidas a ciertos tipos de estreses ambientales (Alassimone et al., 2010) como la salinidad (Karahara et al., 2004; Chen et al., 2011).

#### **IV.4. LA TOXICIDAD DE BORO AFECTA A DIVERSOS PARÁMETROS ECOFISIOLÓGICOS**

##### **IV.4.1. Cambios en la tasa de transpiración, conductancia y abertura estomáticas**

La reducción de la tasa de transpiración es una respuesta de las plantas a varios tipos de estreses abióticos. Por ejemplo, en condiciones de salinidad se ha descrito que la reducción de la tasa de transpiración es una respuesta característica de las líneas de cebada silvestres (*Hordeum spontaneus*) que presentan más tolerancia a la salinidad (Vysotskaya, 2010). La toxicidad de boro provocó una reducción de la conductancia y abertura estomática (Figuras 20C y 21A), lo que causó una disminución de la tasa de transpiración en las plantas de *arabidopsis* del genotipo silvestre (Figura 20B). En plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) también se ha demostrado una relación entre niveles tóxicos de boro y la tasa de transpiración; así, la tasa de transpiración descendió a medida que aumentó el contenido de boro en el agua de riego (Ben-Gal y Shani, 2002). Esta respuesta podría constituir un mecanismo de las plantas para limitar el transporte del exceso de boro desde la raíz hacia las hojas. De hecho, como se ha comentado en la Introducción, el transporte de boro hacia las hojas se realiza principalmente a través del xilema, y es impulsado por la corriente de transpiración (Raven, 1980; Nable et al., 1997); así, estudios previos han demostrado una relación directa entre la tasa de transpiración y la acumulación de boro en las hojas de plantas (Pfeffer et al., 1999; Dannel et al., 2000; Ben-Gal y Shani, 2002). La importancia de este mecanismo –descenso en la tasa de transpiración– se pone de manifiesto en el mutante *nced3*, el cual muestra en condiciones de toxicidad una tasa de transpiración y una acumulación de boro en sus hojas mayores que las del genotipo silvestre (Figuras 20B y 25).

Se ha demostrado que cultivares de cebada tolerantes a la toxicidad de boro se caracterizan por presentar una concentración de boro foliar menor que los cultivares sensibles (Nable et al., 1990). Así, la base para la tolerancia al exceso de boro del cultivar de cebada Sahara se ha relacionado con la presencia de un mecanismo de transporte activo de boro desde el interior de la raíz hacia el medio exterior (Hayes y Reid, 2004). En *arabidopsis* se ha descrito que el gen *BOR4* juega un papel fundamental en este mecanismo de exclusión de boro de la raíz en condiciones de toxicidad de boro (Miwa et al., 2007); así, los niveles foliares y radicales de boro en plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *BOR4* fueron menores que los de las plantas silvestres en condiciones de toxicidad de boro. Además, estas líneas transgénicas mostraron un mayor crecimiento que las plantas silvestres en condiciones de toxicidad de boro (Miwa et al., 2007). En el presente trabajo, el mutante *nced3* tuvo



mayores niveles foliares y radicales de boro que el genotipo silvestre en condiciones de exceso de boro (Figuras 25 y 26), lo que podría sugerir que en este mutante los mecanismos activos de exclusión de boro desde la raíz hacia el exterior están afectados.

Por otro lado, es interesante destacar que las concentraciones foliares de boro insoluble alcanzadas con el tratamiento de toxicidad fueron menores que las de boro soluble en ambos genotipos (Figura 25), lo cual podría deberse a la limitación de la planta para unir el exceso de boro a la pared celular (Dannel et al., 1999). El exceso de boro en las plantas tiende a acumularse al final de la corriente de transpiración (Shelp et al., 1995; Eichert y Goldbach, 2010; Wimmer y Eichert, 2013), hecho que se puso manifiesto en el mutante *nced3* (Figura 19), donde se observaron mayores daños producidos por el exceso de boro en los márgenes de las hojas maduras que en el genotipo silvestre (Figura 19).

El mutante *nced3* se caracterizó por presentar una mayor tasa de transpiración, conductancia y abertura estomática que el genotipo silvestre durante todo el experimento (Figuras 20B,C y 21A), hechos que están relacionados con los niveles reducidos de ABA que muestra este mutante con respecto al silvestre (Figura 30; Iuchi et al. 2001; Frey et al., 2012). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del gen *NCED3* en la regulación de estos parámetros a través del control de los niveles de ABA. No obstante, es interesante destacar que la toxicidad de boro también redujo la tasa de transpiración y la conductancia y abertura estomática en el mutante *nced3* (Figuras 20B,C y 21A), aunque de forma menos marcada que en el genotipo silvestre. Estos resultados demuestran que, además del gen *NCED3*, otros genes de la familia *NCED* podrían estar involucrados en esta respuesta a la toxicidad de boro.

Debido a su elevada tasa de transpiración, el mutante *nced3* mostró una reducida eficiencia en el uso del agua con respecto al genotipo silvestre (Figuras 20B y 21B). Este hecho podría estar relacionado con la menor tolerancia al exceso de boro del mutante en comparación con el genotipo silvestre (Figura 19). No obstante, otros autores han desestimado la importancia de la eficiencia en el uso del agua en la tolerancia a la toxicidad de boro (Nable, 1997).

El transporte de nutrientes desde las raíces hasta las hojas se realiza a través del xilema y depende directamente de la tasa de transpiración y de sus concentraciones (Marschner, 1995). De hecho, estudios previos han demostrado que cambios en la tasa de transpiración pueden alterar el estatus nutricional de las plantas (Del Pozo et al., 2007; McGrath y Lobell, 2013). Sin embargo, a pesar de la reducción observada en la tasa de transpiración, las plantas

de ambos genotipos tratadas con toxicidad de boro no tuvieron un descenso generalizado en sus niveles foliares de los iones analizados (Tablas 8 y 9). Estos resultados podrían ser explicados por una disminución de los requerimientos nutricionales como consecuencia de la inhibición del crecimiento que provoca la toxicidad de boro (Figuras 17 y 19; Nable et al., 1997; Liu et al., 2000; Aquea et al., 2012). Por otro lado, en las raíces se observó una disminución del contenido de calcio y magnesio en condiciones de toxicidad de boro (Tabla 9), lo cual pudiera deberse a una disminución del flujo radial de agua como consecuencia del incremento de las barreras apoplásticas en la raíz (ver Discusión, IV.3.; Ghanati et al., 2005).

#### IV.4.2. Cambios en la tasa de fotosíntesis y en la eficiencia del PSII

El efecto negativo de la toxicidad de boro sobre la tasa de fotosíntesis ha sido ampliamente estudiado (Han et al., 2009; Chen et al., 2013; Landi et al., 2013a,b). Por ejemplo, Landi et al. (2013a) observaron que el exceso de boro afectaba de manera negativa al aparato fotosintético en plantas de calabacín y pepino. Así, la toxicidad de boro alteró el contenido de pigmentos fotosintéticos y causó una disminución en la eficiencia del PSII (Landi et al., 2013a). En este estudio la toxicidad de boro también disminuyó la tasa de fotosíntesis (Figura 20A), el contenido de pigmentos fotosintéticos (Figura 23) y la eficiencia cuántica máxima del PSII (Figura 22A). El proceso de fotosíntesis es un gran productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Logan, 2005), las cuales causan daños en las proteínas y membranas celulares (Molassiotis et al., 2006). Se ha demostrado que la toxicidad de boro provoca un aumento en la producción de ROS (Cervilla et al., 2007; Ardic et al., 2008), lo que explicaría el daño que ocasiona este estrés en la tasa de fotosíntesis (Cervilla et al., 2007; Ardic et al., 2008).

En las plantas vasculares la sacarosa y el almidón son los principales productos de la fotosíntesis. A pesar de la disminución de la tasa fotosintética causada por la toxicidad de boro en ambos genotipos (Figura 20A), no se observó una disminución en el contenido de carbohidratos en las hojas de las plantas de ambos genotipos (Figura 24). Este resultado podría explicarse por un descenso en los requerimientos energéticos de los tejidos como consecuencia de la inhibición de su crecimiento en condiciones de toxicidad de boro (Nable, 1988 y 1997). Interesantemente, en las plantas del mutante *nced3* tratadas con toxicidad de boro se observó un aumento de los niveles foliares de sacarosa (Figura 24C), hecho que

podría estar relacionado con el mantenimiento del potencial osmótico de las células para evitar la pérdida excesiva de agua (Choi et al., 2007).

#### **IV.5. LA TOXICIDAD DE BORO REDUCE EL TRANSPORTE DE AGUA**

El balance hídrico de las plantas está determinado por la cantidad de agua absorbida por las raíces, el agua transportada por el sistema vascular y el agua perdida a través de la superficie de las hojas por transpiración. La mayoría de los estreses abióticos modifican el balance hídrico de las plantas afectando a uno o a varios de los parámetros antes mencionados (Aroca et al., 2012). Por ejemplo, se ha descrito que la deficiencia en boro afecta al balance hídrico de la planta disminuyendo el transporte de agua hacia las hojas como consecuencia de los daños que produce en la estructura del xilema (Wimmer y Eichert, 2013). Sin embargo, el estrés por salinidad provoca una clara reducción en la permeabilidad de la raíz al agua (conductividad hidráulica de la raíz) que modifica el balance hídrico en muchas especies de plantas (Martínez-Ballesta et al., 2000 y 2003; Boursiac et al., 2005; Horie et al., 2011; Aroca et al., 2012).

En este trabajo se determinó el flujo relativo de agua con el fin de investigar los efectos de la toxicidad de boro en el transporte de agua en las plantas de *arabidopsis*. La toxicidad de boro redujo los valores del flujo relativo de agua tanto en el genotipo silvestre como en el mutante *nced3* tras 24 y 48 horas de tratamiento en comparación con las condiciones control (Figura 32). Este efecto de la toxicidad de boro puede ser explicado por las siguientes causas:

1.- Por una disminución de la tasa de transpiración. Como se ha comentado en el apartado anterior, la toxicidad de boro disminuye la tasa transpiración de los genotipos silvestre y mutante *nced3* de *arabidopsis*, lo que provocaría un descenso en el transporte de agua en ambos genotipos (Figura 20B).

Es interesante destacar que el flujo relativo de agua en el mutante *nced3* fue alrededor del 32 % superior al del genotipo silvestre (Figura 32), lo que podría ser una consecuencia de su elevada tasa de transpiración (Figura 20B, Iuchi et al., 2001, Frey et al., 2012). Este resultado pone de manifiesto la relación que existe entre la tasa de transpiración y el flujo relativo de agua en las plantas de *arabidopsis*.

2.- Por una reducción de la conductividad hidráulica entre las células de las hojas. De hecho, se ha propuesto que la toxicidad de boro disminuye la permeabilidad al agua de las células que rodean los haces vasculares de la hoja con el fin de conducir los solutos no absorbidos hacia los hidátodos (Shatil-Cohen y Moschelion, 2012).

3.- Por una reducción del suministro de agua por parte de las raíces. Más del 50 % del agua transpirada por las plantas pasa a través de las membranas celulares y las acuaporinas participan directamente en este proceso (Tyerman et al., 2002; Wimmer y Eichert, 2013). Estudios previos han demostrado que la toxicidad de boro causa una disminución en la expresión de genes que codifican algunas de las proteínas PIP más abundantes en las raíces de *arabidopsis* (Monneuse et al., 2011). En el presente trabajo se observó una reducción en la expresión radical de los genes *PIP1;1* y *PIP1;2* tras 24 horas de tratamiento de toxicidad de boro en ambos genotipos (Figura 33A,B); sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de expresión de los genes *PIP2;1* y *PIP2;2* (Figura 33C,D). Estos resultados estuvieron en consonancia con los obtenidos en el análisis de la abundancia de las acuaporinas PIP1 y PIP2 en la fracción microsomal de las raíces de *arabidopsis* (Figura 34). Esta disminución en los niveles de transcritos y de proteínas PIP1 observados en condiciones de toxicidad de boro podría contribuir a una disminución de la conductividad hidráulica de la raíz (Postaire et al., 2010). Además, como se ha mencionado anteriormente, la toxicidad de boro también podría causar una disminución del flujo radial de agua como consecuencia de una intensificación de las barreras apoplásticas (Figura 13).

La importancia de las acuaporinas en la respuesta de las plantas a la toxicidad de boro podría estar también relacionada con la capacidad que muestran algunas de ellas para transportar boro. Así, la expresión de la acuaporina PIP1 de maíz en oocitos de *Xenopus* aumentó la permeabilidad de la membrana al paso de boro en un 30 % (Dordas et al., 2000). Otros estudios también han mostrado un aumento de la sensibilidad a la toxicidad de boro en levaduras que expresan las proteínas PIP1;3 y PIP1;4 de cebada (Fitzpatrick y Reid, 2009). Por otro lado, se ha demostrado que mediante la modulación de la expresión de ciertas acuaporinas se pueden conseguir plantas más resistentes a la toxicidad de boro. Así, por ejemplo, la sobreexpresión de los genes de arroz (*Oryza sativa*) *OsPIP2;4* y *OsPIP2;7* confiere tolerancia a la toxicidad de boro mediante la creación de un flujo activo de boro desde la raíz hacia el medio exterior (Kumar et al., 2013). También se ha demostrado que la sobreexpresión de la acuaporina del tonoplasto TIP5;1 de *A. thaliana* confiere tolerancia a la toxicidad de boro mediante la reducción de los niveles de boro en el citosol (Pang et al., 2010).

## **V. CONCLUSIONES**

1. La toxicidad de boro (5 mM) causa una reducción significativa del crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales en los genotipos silvestres y mutante *nced3* de *Arabidopsis thaliana*. En esta reducción podría jugar un papel importante el etileno, cuyos niveles radicales aumentarían como consecuencia del incremento en la expresión del gen *ACS11*.
2. La expresión de los genes *NCED3*, *ABII* y *ABI2* aumenta en las raíces de arabidopsis a partir de 6 horas de tratamiento con toxicidad de boro. Estos resultados sugieren que el ácido abscísico (ABA) desempeña una función esencial en la respuesta de arabidopsis al estrés causado por la toxicidad de boro.
3. La toxicidad de boro incrementa en las raíces la expresión de los genes *CASP4* y *CASP5* y de diferentes lacasas y peroxidasas, así como las actividades enzimáticas NADPH oxidasa y peroxidasa, que intervienen en la formación de la banda de Caspary. Estos resultados, junto con el aumento de la autofluorescencia emitida por dicha banda en las raíces tratadas con toxicidad de boro, sugieren que este estrés provoca un aumento del grosor de la banda de Caspary, lo cual limitaría el flujo radial de agua hacia el interior de la raíz.
4. La toxicidad de boro disminuye la tasa de fotosíntesis, el contenido de pigmentos fotosintéticos y la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II en ambos genotipos.
5. La toxicidad de boro reduce la conductancia y abertura estomáticas en ambos genotipos, lo cual se correlaciona con la disminución de la tasa de transpiración. Con todo, estos parámetros son mayores en el mutante *nced3* que en el genotipo silvestre, hechos que están relacionados con los menores niveles de ABA que tiene este mutante con respecto al silvestre. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del gen *NCED3* en la regulación de la tasa de transpiración, conductancia y abertura estomáticas a través del control de los niveles de ABA. No obstante, además del gen *NCED3*, otros genes de la familia *NCED* también contribuirían a regular los niveles de ABA en la respuesta a la toxicidad de boro.
6. El flujo relativo de agua en el mutante *nced3* es significativamente superior que el del genotipo silvestre, lo que podría ser una consecuencia de su mayor tasa de transpiración.
7. La toxicidad de boro disminuye el flujo relativo de agua tanto en el genotipo silvestre como en el mutante *nced3*. Este efecto de la toxicidad de boro puede ser explicado por tres causas: (i) una disminución de la tasa de transpiración, (ii) por una reducción de la

conductividad hidráulica entre las células de las hojas, o (iii) por una reducción del suministro de agua procedente de las raíces.

8. La toxicidad de boro reduce la expresión radical de los genes *PIP1;1* y *PIP1;2* en ambos genotipos. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en el análisis de la abundancia de las acuaporinas PIP1 y PIP2 en la fracción microsomal de las raíces de arabidopsis. Este descenso en los niveles de transcritos y de proteínas PIP1 observados en condiciones de toxicidad de boro podría traducirse en una disminución de la conductividad hidráulica de la raíz.
9. El mutante *nced3* tiene mayores niveles foliares y radicales de boro que el genotipo silvestre en condiciones de exceso de boro, lo que podría ser una consecuencia de sus mayores tasa de transpiración y flujo relativo de agua.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



**Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E. Jr. (1992).** Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. Academic Press, San Diego.

**Agre P., Saboori A.M., Asimos A., Smith B.L. (1987).** Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J. Biol. Chem.* 262: 17497-17503.

**Alassimone J., Naseer S., Geldner N. (2010).** A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(11): 5214-5219.

**An F., Zhao Q., Ji Y., Li W., Jiang Z., Yu X., Zhang C., Han Y., He W., Liu Y., Zhang S., Ecker J., Guo H. (2010).** Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 2384-2401.

**Aquea F., Federici F., Moscoso C., Vega A., Jullian P., Haseloff J., Arce-Johnson P. (2012).** A molecular framework for the inhibition of *Arabidopsis* root growth in response to boron toxicity. *Plant Cell Environ.* 35(4): 719-34.

**Ardic M., Sekmen A.H., Tokur S., Ozdemir F., Turkan I. (2009).** Antioxidant response of chickpea plants subjected to boron toxicity. *Plant Biol.* 11: 328-338.

**Aroca R., Vernieri P., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz M., Tognoni F., Pardossi A. (2003).** Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays L.*) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science* 165: 671-679.

**Aroca R., Porcel R., Ruíz-Lozano J.M. (2012).** Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 63: 43-57.

**Bellaloui N., Brown P.H., Dandekar A.M. (1999).** Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiol.* 119: 735- 741.

**Benga G., Popescu O., Borza V., Pop VI, Muresan A., Mocsy I., Brain A., Wrigglesworth J.M. (1986).** Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport. *Eur. J. Cell Biol.* 41: 252-262.

**Ben-Gal A., Shani U. (2002).** Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress. *Plant Soil* 247: 211-221.

**Berthet S., Demont-Caulet N., Pollet B., Bidzinski P., Cézard L., Le Bris P., Borrega N., Hervé J., Blondet E., Balzergue S., Lapierre C., Jouanin L. (2011).** Disruption of

*LACCASE4* and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell* 23: 1124–1137.

**Biela A., Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R., Kaldenhoff R. (1999).** The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.* 18: 565-570.

**Bienert G.P., Moller A.L., Kristiansen K.A. (2007).** Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282(2): 1183-1192.

**Bisson M.M., Groth G. (2010).** New insight in ethylene signaling: autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Mol. Plant* 3: 882-889.

**Bolaños L., Mateo P., Bonilla I. (1993).** Calcium-mediated recovery of boron deficient *Anabaena* sp. PCC 7119 grown under nitrogen fixing conditions. *J. Plant Physiol.* 142: 513-517.

**Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D. (2004).** Why boron? *Plant Physiol. Biochem.* 42: 907-912.

**Bonilla I., García-González M., Mateo P. (1990).** Boron requirement in cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* 94: 1554-1560.

**Bonilla I., Bolaños L., Mateo P. (1995).** Interaction of boron and calcium in the cyanobacteria *Anabaena* and *Synechococcus*. *Physiol. Plant.* 94: 31-36.

**Boursiac Y., Chen S., Luu D.T., Sorieul M., van den Dries N., Maurel C. (2005).** Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* 139: 790-805.

**Britto D.T., Kronzucker H.J. (2002).**  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.* 159: 567-584.

**Brown P.H., Hu H. (1996).** Phloem mobility of boron is species dependent. Evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Ann. Bot.* 77: 497-505.

**Brown P.H., Shelp B.J. (1997).** Boron mobility in plants. *Plant Soil* 193: 85-101.

**Brown P.H., Bellaloui N., Hu H., Dandekar A. (1999).** Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency. *Plant Physiol.* 119: 17-20.

- Brown P.H., Bellaloui N., Wimmer M.A., Bassil E.S., Ruiz J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F., Römheld V. (2002).** Boron in plant biology. *Plant Biol.* 4: 205-223.
- Camacho-Cristóbal J.J., Rexach J., Al-Ghazi Y., Conéjero G., Nacry P., Doumas P. (2008).** PRD, an Arabidopsis ANTIGUMENTA-like gene, is involved in root architectural changes in response to phosphate starvation. *Planta* 228: 511-522.
- Cervilla L.M., Blasco B., Rios J.J., Romero L., Ruiz J.M. (2007).** Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plant subjected to boron toxicity. *Ann. Bot.* 100: 747-756.
- Chae H.S., Kieber J.J. (2005).** Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 10: 291-296.
- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J., Jung R. (2001).** Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125: 1206-1215.
- Chen Y.F., Gao Z.Y., Kerris R.J., Wang W.Y., Binder B.M., Schaller G.E. (2010).** Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in Arabidopsis. *Plos One* 5: 8640.
- Chen T., Cai X., Wu X., Karahara I., Schreiber L., Lin J. (2011).** Casparian strip development and its potential function in salt tolerance. *Plant Signal. Behav.* 6: 1499-1502.
- Cheng Z., Targolli J., Huang X., Wu R. (2002).** Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.* 10: 71-82.
- Choi W.G., Roberts D.M. (2007).** Arabidopsis *NIP2;1*, a Major Intrinsic Protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *J. Biol. Chem.* 282(33): 24209-24218.
- Chrispeels M.J., Agre P. (1994).** Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. *Trends Biochem. Sci.* 19(10): 421-425.
- Chrispeels M.J., Crawford N.M., Schroeder J.I. (1999).** Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-676.
- Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. (2010).** Absciscic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651-679.

- Da Ines O., Graf W., Franck K.I., Albert A., Winkler J.B., Scherb H., Schäffner A.R. (2010).** Kinetic analyses of plant water relocation using deuterium as tracer - reduced water flux of *Arabidopsis pip2* aquaporin knockout mutants. *Plant Biol.* 12(1): 129-39.
- Dannel F., Pfeffer H., Romheld V. (1999).** Distribution within the plant or compartmentation does not contribute substantially to the detoxification of excess boron in sunflower (*Helianthus annuus*). *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 95-99.
- Dannel F., Pfeffer H., Römheld V. (2000).** Characterization of root boron pool, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotopes <sup>10</sup>B and <sup>11</sup>B. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 397-405.
- Dannel F., Pfeffer H., Römheld V. (2002).** Update on boron in higher plant-uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biol.* 4: 193-204.
- Dello Ioio R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. (2007).** Cytokinins determine *Arabidopsis* root meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17: 678–682.
- Doerner P., Jorgensen J.E., You R., Steppuhn J., Lamb C. (1996).** Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380: 520-523.
- Dordas C., Brown P.H. (2000).** Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *J. Membr. Biol.* 175: 95-105.
- Dordas C., Chrispeels M.J., Brown P.H. (2000).** Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* 124: 1349-1361.
- Eckert M., Biela A., Siefritz F., Kaldenhoff R. (1999).** New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *J. Exp. Bot.* 50: 1541-1545.
- Eichert T., Goldbach H.E. (2010).** Transpiration rate affects the mobility of foliar-applied boron in *Ricinus communis* L. cv. Impala. *Plant Soil* 328: 165-174.
- Fagerstedt K.V., Kukkola E.M., Koistinen V.T., Takahashi J., Marjamaa K. (2010).** Cell wall lignin is polymerised by class III secreted plant peroxidases in Norway spruce. *J. Integr. Plant Biol.* 52(2): 186-194.
- Fitzpatrick K.L., Reid R.J. (2009).** The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots. *Plant Cell Environ.* 32: 1357-1365.

- Flowers T.J., Hajibagheri M.A., Yeo A.R. (1991).** Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant Cell Environ.* 14: 319-325.
- Frey A., Effroy D., Lefebvre V., Seo M., Perreau F., Berger A., Marion-Poll A. (2012).** Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant J.* 70 (3): 501-12.
- Ghanati F., Morita A., Yokota H. (2002).** Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48: 357-364.
- Ghanati F., Morita A., Yokota H. (2005).** Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron. *Plant Sci.* 168(2): 397-405.
- Goldberg S. (1997).** Reactions of boron with soils. *Plant Soil* 193: 35-48.
- González-Guzmán M., Apostolova N., Belles J.M., Barrero J.M., Piqueras P., Ponce M.R., Micol J.L., Serrano R., Rodríguez P.L. (2002).** The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin into abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14: 1833-1846.
- González-Guzmán M., Abia D., Salinas J., Serrano R., Rodríguez P.L. (2004).** Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol.* 135: 325-333.
- Grebe M. (2011).** Plant biology: unveiling the Casparian strip. *Nature* 473 (7347): 294-295.
- Greenwood A., Earnshaw A. (1984).** Chemistry of the elements. Pergamon Press, Oxford.
- Guidi L., Degl'Innocenti E., Carmassi G., Massa D., Pardossi A. (2011).** Effects of boron on leaf chlorophyll fluorescence of greenhouse tomato grown with saline water. *Environ. Exp. Bot.* 73:57-63.
- Gupta U.C. (1979).** Boron nutrition of crops. *Adv. Agron.* 31: 273-307.
- Han S., Tang N., Jiang H. X., Yang L.T., Lee Y., Chen L.S. (2009).** CO<sub>2</sub> assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress. *Plant Sci.* 176: 143-153.
- Hauser F., Waadt R., Schroeder J.I. (2011).** Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: R346-R355.

- Hayes J.E., Reid R.J. (2004).** Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant Physiol.* 136: 3376-3382.
- Herrera-Rodríguez M.B., González-Fontes A., Rexach J., Camacho-Cristóbal J.J., Maldonado J.M., Navarro-Gochicoa M.T. (2010).** Role of boron in vascular plants and response mechanisms to boron stress. *Plant Stress* 4: 115-122.
- Hirayama T., Shinozaki K. (2007).** Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant. Sci.* 12: 343-51.
- Holm L.M., Jahn T.P., Moller A.L., Schjoerring J.K., Ferri D., Klaerke D.A., Zeuthen T. (2005).** NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Archiv.* 450: 415-428.
- Horie T., Brodsky D.E., Costa A., Kaneko T., Lo Schiavo F., Katsuhara M., Schroeder J.I. (2011).** K<sup>+</sup> transport by the OsHKT2;4 transporter from rice (*Oryza sativa*) with atypical Na<sup>+</sup> transport properties and competition in permeation of K<sup>+</sup> over Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions. *Plant Physiol.* 156: 1493-1507.
- Hu H., Brown P.H., Labavitch J.H. (1996).** Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.* 47: 227-232.
- Hu H., Brown P.H. (1997).** Absorption of boron by plant roots. *Plant Soil* 193: 49-58.
- Hua J., Meyerowitz E.M. (1998).** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-271.
- Huang L., Bell R.W., Dell B. (2001).** Boron supply into wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Wilgoyne) ears whilst still enclosed within leaf sheaths. *J. Exp. Bot.* 52: 1731-1738.
- Huang L., Bell R.W., Dell B. (2008).** Evidence of phloem boron transport in response to interrupted boron supply in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Kiev mutant) at the reproductive stage. *J. Exp. Bot.* 59: 575-583.
- Hubbard K.E., Nishimura N., Hitomi K., Getzoff E.D., Schroeder J.I. (2010).** Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24: 1695-1700.
- Hunt C.D. (2002).** Boron binding biomolecules: a key to understanding the beneficial physiologic effects of dietary born from prokaryotes to humans. *Boron in Plant and Animal Nutrition*. Kluwer Academic, New York, USA.

- Iuchi S., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2000).** A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* 123: 553-562.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Shinozaki K. (2001).** Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 325-33.
- Johanson U., Karlsson M., Johansson I., Gustavsson S., Sjövall S., Fraysse L., Weig A.R., Kjellbom P. (2001).** The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.* 126: 1358-1369.
- Jung J.S., Preston G.M., Smith B.L., Guggino W.B., Agre P. (1994).** Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269: 14648-14654.
- Karabal E., Yucel M., Oktem H.A. (2003).** Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Sci.* 164: 925-933.
- Karahara I., Ikeda A., Kondo T., Uetake Y. (2004).** Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219: 41-47.
- Kato Y., Miwa K., Takano J., Wada M., Fujiwara T. (2009).** Highly boron deficiency-tolerant plants generated by enhanced expression of NIP5;1, a boric acid channel. *Plant Cell Physiol.* 50: 58-66.
- Katsuhara M., Hanba Y.T., Shiratake K., Maeshima M. (2008).** Expanding roles of plants aquaporins in plasma membranes and cell organelles. *Funct. Plant* 35: 1-14.
- Kende H. (1993).** Ethylene biosynthesis. *Plant. Mol. Biol.* 44: 283-307.
- Kistler R.B., Helvaci C. (1994).** Boron and Borates. Industrial minerals and rocks, society for mining, 6th ed. Metallurgy and Exploration Inc. Littleton.
- Kobayashi M., Matoh T., Azuma J. (1996).** Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110: 1017-1020.
- Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R. (2006).** The aquaporins. *Genom. Biol.* 7(2): 206.



- Kumar K., Mosa K. A., Chhikara S., Musante C., White J. C., Dhankher O. P. (2013).** Two rice plasma membrane intrinsic proteins, OsPIP2;4 and OsPIP2;7, are involved in transport and providing tolerance to boron toxicity. *Planta* 239(1): 187-198.
- Landi M., Remorini D., Pardossi A., Guidi L. (2013a).** Boron excess affects photosynthesis and antioxidant apparatus of greenhouse *Cucurbita pepo* and *Cucumis sativus*. *J. Plant Research* 126: 775-786.
- Landi M., Pardossi A., Remorini D., Guidi L. (2013b).** Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess. *Environ. Exp. Bot.* 85: 64-75.
- Le J., Vandenbussche F., Van Der Straeten D., Verbelen J.P. (2001).** In the early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiol.* 125: 519-522.
- Lee Y., Rubio M.C., Alassimone J., Geldner N. (2013).** A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* 153: 402-412.
- Lemarchand D., Gaillardet J., Lewin E., Allégre C.J. (2000).** The influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH. *Nature* 408: 951-954.
- Liang X., Abel S., Keller J., Shen N., Theologis A. (1992).** The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11046-11050.
- Liu D., Jiang W., Zhang L., Li L. (2000).** Effects of boron ions on root growth and cell division of broad bean (*Vicia faba* L.). *Isr. J. Plant Sci.* 48: 47-51.
- Logan B.A. (2005).** Reactive oxygen species and photosynthesis. *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants*, Blackwell Publishing, Oxford.
- Loomis W.D., Durst R.W. (1992).** Chemistry and biology of boron. *Biofactors* 3: 229-239.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L. (2003).** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- Lovatt C.J., Bates L.M. (1984).** Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *J. Exp. Bot.* 35(152): 297-305.



- Macey R.I. (1984).** Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* 246: C195-203.
- Mahboobi H., Yucel M., Öktem H. A. (2001).** Cell wall uronic acid concentrations of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *J. Plant Nutr.* 24(12): 1965-1973.
- Marschner H. (1995).** Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd edn. Academic Press. San Diego.
- Martín-Rejano E.M., Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., González-Fontes A. (2011).** Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in *Arabidopsis* seedlings. *Physiol. Plant.* 142: 170-178.
- Martínez-Ballesta M.C., Martínez V., Carvajal M. (2000).** Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 685-691.
- Martínez-Ballesta M.C., Aparicio F., Pallas V., Martínez V., Carvajal M. (2003)** Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 160: 689-697.
- Martínez-Ballesta M. C., Bastías E., Carvajal M. (2008).** Combined effect of boron and salinity on water transport: the role of aquaporins. *Plant Signal. Behav.* 3: 844-845.
- Martínez Beltrán J., Koo-Oshima S. (2006).** Water desalination for agricultural applications. FAO, Roma.
- Mateo P., Bonilla I., Fernández-Valiente E., Sánchez-Maeso E. (1986).** Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119. *Plant Physiol.* 81: 430-433.
- Matoh T., Ochiai K. (2005).** Distribution and partitioning of newly taken-up boron in sunflower. *Plant Soil* 278: 351-360.
- Maurel C. (2007).** Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581(12): 2227-36.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. (2008).** Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 595-624.

- Merchante C., Vallarino J. G., Osorio S., Aragüez I., Villarreal N., Ariza M. T. (2013).** Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *J. Exp. Bot.* 64: 4421-4439.
- Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T. (2007).** Plants tolerant of high boron levels. *Science* 318: 1417.
- Miwa K., Fujiwara T. (2010).** Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Ann. Bot.* 105: 1103-1108.
- Miwa K., Wakuta S., Takada S., Ide K., Takano J., Naito S., Fujiwara T. (2013).** Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 163(4): 1699-709.
- Miyakawa T., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Tanokura M. (2012).** Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Sci.* 18: 259-266.
- Molassiotis A., Tanou G., Diamantidis G., Patakas A., Therios I. (2006).** Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *J. Plant Physiol.* 163: 176-185.
- Moss S.A., Nagpal, N.K. (2003).** Ambient water quality guidelines for boron- full report. British Columbia. Water, Air and Climate Change Branch.
- Mou D., Yao Y., Yang Y., Zhang Y., Tian C., Achal V. (2011).** Plant high tolerance to excess manganese related with root growth, manganese distribution and antioxidative enzyme activity in three grape cultivars. *Ecotox. Environ. Saf.* 74: 776-786.
- Mullineaux P.M., Baker N.R. (2010).** Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiol.* 154: 521-525.
- Muntean D.W. (2009).** Boron, the overlooked essential element. Soil and Plant Lab. Articles. Bellevue, WA.
- Nable R.O. (1988).** Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant Soil* 112: 45-52.
- Nable R.O., Ba G.S., Paull J.G. (1997).** Boron toxicity. *Plant Soil* 198: 181-198.

- Naseer S., Lee Y., Lapierre C., Franke R., Nawrath C., Geldner N. (2012).** Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 10101-10106.
- Neill S.J., Burnett E.C., Desikan R., Hancock J.T. (1998).** Cloning of a wilt-responsive cDNA from an *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase. *J. Exp. Bot.* 49: 1893-1894.
- Noguchi K., Yasumori M., Imai T., Naito S., Matsunaga T., Oda H., Hayashi H., Chino M., Fujiwara T. (1997).** *bor1-1*, an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *Plant Physiol.* 115: 901-906.
- O'Neill M.A., Warrenfeltz D., Kates K., Pellerin P., Doco T., Darvill A.G., Albersheim P. (1996).** Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plants, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate di-ester. *J. Biol. Chem.* 271: 22923-22930.
- O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A.G. (2004).** Rhamnogalacturonan II: structure and function of borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 109-139.
- Okhuma K., Lyon J.L., Addicott F.T., Smith O.E. (1963).** Abscisin II, an abscission accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142: 1592-1593.
- Pang Y., Li L., Ren F., Lu P., Wei P., Cai J., Xin L., Zhang J., Chen J., Wang X. (2010).** Overexpression of the tonoplast aquaporin AtTIP5;1 conferred tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis*. *J. Genet. Genomics* 37: 389-397.
- Parks J.L., Edwards M. (2005).** Boron in the environment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Bio.* 35: 81-114.
- Park S.Y., Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., Zhao Y., Lumba S., Santiago J., Rodrigues A., Chow T.F., Alfred S.E., Bonetta D., Finkelstein R., Provart N.J., Desveaux D., Rodriguez P.L., McCourt P., Zhu J.K., Schroeder J.I., Volkman B.F., Cutler S.R. (2009).** Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.
- Paull J.G., Nable R.O., Rathjen A.J. (1992).** Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding. *Plant Soil* 146: 251-260.

- Peleg Z., Blumwald E. (2011).** Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 290-295.
- Pfeffer H., Dannel F., Römheld V. (1999).** Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower? *J. Plant Physiol.* 155: 34-40.
- Postaire O., Tournaire-Roux C., Grondin A., Boursiac Y., Morillon R., Schaffner A.R., Maurel C. (2010).** A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152: 1418-1430.
- Power P.P., Woods W.G. (1997).** The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil* 193: 1-13.
- Preston G.M., Agre P. (1991).** Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11110-11114.
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P. (1992).** Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385-387.
- Qin X., Zeevaart J.A.D. (1999).** The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15354-15361.
- Raven J.A. (1980).** Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.* 84: 231-249.
- Reid R.J., Hayes J.E., Post A., Stangoulis J.C.R., Graham R.D. (2004).** A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant Cell Environ.* 27: 1405-1414.
- Reid R. (2007).** Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant and Cell Physiol.* 48: 1673-1678.
- Reid R. J., Fitzpatrick K. L. (2009).** Redistribution of boron in leaves reduces boron toxicity. *Plant. Signal. Behav.* 4: 1091-1093.
- Robert H. S., Friml J. (2009).** Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chem. Biol.* 5(5): 325-332.
- Roessner U., Patterson J.H., Forbes M.G., Fincher G.B., Langridge P., Bacic A. (2006).** An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics. *Plant Physiol.* 142: 1087-1101.

- Roppolo D., De Rybel B., Tendon V. D., Pfister A., Alassimone J., Vermeer J. E. M., Geldner N. (2011).** A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473(7347): 380-383.
- Ruiz-Lozano J.M., Alguacil M.M., Bárzana G., Vernieri P., Aroca R. (2009).** Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. *Plant Molecular Biology* 70(5): 565-79.
- Ruuhola T., Keinänen M., Keski-Saari S., Lehto T. (2011).** Boron nutrition affects the carbon metabolism of silver birch seedlings. *Tree Physiol.* 31: 1251-1261.
- Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., Maeshima M. (2005).** Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46: 1568-1577.
- Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. (1999).** Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* 50: 1267-1280.
- Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J.A., McCarty D.R. (1997).** Species oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.
- Shaffer D.L., Yin N., Gilron J., Elimelech M. (2012).** Seawater desalination for agriculture by integrated forward and reverse osmosis: Improved product water quality for potentially less energy. *J. Membr. Sci.* 1(8): 415-416.
- Shatil-cohen A., Moshelion M. (2012).** The bundle sheath role as xylem-mesophyll barrier, *Plant Signal. Behav.* 7(2012): 1088–1091.
- Sheldon A.R., Menzies N.W. (2005).** The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes Grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant Soil* 278(1-2): 341-349.
- Shelp B.J., Marentes E., Kithaka A.M., Vivekanandan P. (1995).** Boron mobility in plants. *Physiol. Plant.* 94: 356-361.
- Shelp B.J., Kithaka A.M., Vanderpool R.A., Van Cauwenberghe O.R., Spiers G.A. (1998).** Xylem-to-phloem transfer of boron in broccoli and lupin during early reproductive growth. *Physiol. Plant.* 104: 533-540.

- Shomron N., Ast G. (2003).** Boric acid reversibly inhibits the second step of pre-mRNA splicing. *FEBS Lett.* 552: 219-224.
- Shorrocks V.M. (1997).** The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil* 193: 121-148.
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Sakran A.M., Ali H.M., Basalah M.O., Faisal M., Alatar A., Al-Amri A.A. (2013).** Calcium-induced amelioration of boron toxicity in radish. *J. Plant. Growth Regul.* 32: 61-71.
- Sommer A.L. (1931).** Copper as an essential for plant growth. *Plant Physiol.* 6: 339-345.
- Stangoulis J.C.R., Brown P.H., Bellaloui N., Reid R.J., Graham R.D. (2001a).** The efficiency of boron utilization in canola. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1109-1114.
- Stangoulis J.C.R., Reid R.J., Brown P.H., Graham R.D. (2001b).** Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta* 213: 142-146.
- Steudle E., Peterson C.A. (1998).** How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49: 775-788.
- Steudle E. (2001).** The cohesion–tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52: 847-875.
- Sun P., Tian Q.Y., Chen J., Zhang W.H. (2010).** Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *J. Exp. Bot.* 61: 347-356.
- Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T., Bennett M. (2002).** Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development. *Plant Mol. Biol.* 49: 411-426.
- Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten D., Beemster G.T., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M. (2007).** Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186-2196.
- Taiz L., Zeiger E. (2010).** *Plant Physiology*, 5th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Takano J., Yamagami M., Noguchi K., Hayashi H., Fujiwara T. (2001).** Preferential translocation of boron to young leaves in *Arabidopsis thaliana* regulated by the *BOR1* gene. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47: 345-357.

- Takano J., Noguchi K., Yasumori M., Kobayashi M., Gajdos Z., Miwa K., Hayashi H., Yoneyama T., Fujiwara T. (2002).** *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* 420: 337-340.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wirén N., Fujiwara T. (2006).** The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18: 1498-1509.
- Takano J., Tanaka M., Toyoda A., Miwa K., Kasai K., Fuji K., Onouchi H., Naito S., Fujiwara T. (2010).** Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 5220-5225.
- Takatsuka H., Umeda M. (2014).** Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* 65: 2633-2643.
- Tan B.C., Schwartz S.H., Zeevaart J.A., McCarty D.R. (1997).** Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12235-12240.
- Tan B.C., Joseph L.M., Deng W.T., Liu L., Li Q.B., Cline K., McCarty D.R. (2003).** Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9 *-cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* 35(1): 44-56.
- Tanaka M., Fujiwara T. (2008).** Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Eur. J. Physiol.* 456: 671-677.
- Tanaka M., Wallace I.S., Takano J., Roberts D.M., Fujiwara T. (2008).** NIP6;1 is a acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2860-2875.
- Tariq M., Mott C.F.B. (2007).** The significance of boron in plant nutrition and environment- A review. *J. Agron.* 6: 1-10.
- Tognetti J.A., Pontis H.G., Martínez-Noël G.M.A. (2013).** Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signal. Behav.* 8: 1-10.
- Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Tajkhorshid E., Neutze R., Kjellbom P. (2006).** Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-94.

- Tsang D.L., Edmond C., Harrington J.L., Nühse T.S. (2011).** Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene-independent pathway. *Plant Physiol.* 156: 596-604.
- Tyerman S. D., Niemietz C. M., Bramley H. (2002).** Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25: 173-194.
- Uehlein N., Fileschi K., Eckert M., Bienert G., Bertl A., Kaldenhoff R. (2007).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68: 122-129.
- Vengosh A., Heumann K.G., Juraski S., Kasher R. (1994).** Boron isotope application for tracing sources of contamination in ground- water. *Environ. Sci. Tech.* 28: 1968-1974.
- Vysotskaya L., Hedley P.E., Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Morris J., Jones H.G. (2010).** Effect of salinity on water relations of wild barley plants differing in salt tolerance. *AoB Plants* 86: 407-421.
- Wallace I.S., Roberts D.M. (2004).** Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis Major Intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/Arginine selectivity filter. *Plant Physiol.* 135: 1059-1068.
- Wallace I.S., Roberts D.M. (2005).** Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochem.* 44: 16826-16834.
- Warington K. (1923).** The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.* 37: 629-672.
- Wilkinson S., Davies W.J. (2002).** ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 25: 195-210.
- Wilkinson S., Hartung W. (2009).** Food production: reducing water consumption by manipulating long-distance chemical signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 60: 1885-1891.
- Wimmer M.A., Eichert T. (2013).** Review: mechanisms for boron deficiency-mediated changes in plant water relations. *Plant Sci.* 203–204: 25–32.
- Yan X., Wu P., Ling H., Xu G., Xu F., Zhang Q. (2006).** Plant nutriomics in China: an overview. *Ann. Bot.* 98: 473-482.



**Yermiyahu U., Tal A., Ben-Gal A., Bar-Tal A., Tarchitzky J., Lahav O. (2007).** Rethinking desalinated water quality and agriculture. *Science* 318: 920-921.

**Zhao Q., Nakashima J., Chen F., Yin Y., Fu C., Yun J., Shao H., Wang X., Wang Z.Y., Dixon R.A. (2013).** Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 3976-3987.

**Zhang J., Zhang X., Liang J. (1995).** Exudation rate of hydraulic conductivity of maize roots are enhanced by soil drying and abscisic acid treatment. *New Phytol.* 131: 329-336.

**Zhang J., Jia W., Yang J., Ismail A.M. (2006).** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop. Res.* 97: 111-119.